

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PRIORITY DOCUMENT

REC'D
WIPO
29 MAY 1995
PCT

BREVETS D'INVENTION

CERTIFICATS D'UTILITÉ - CERTIFICATS D'ADDITION

Copie officielle

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme, d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris le 2 MAI 1995

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

answered

Yves CAMPENON



THIS PAGE BLANK (USPTO)

VPI

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

cerfa

N° 55 - 1222

REQUÊTE**EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE ***

1

a	<input checked="" type="checkbox"/>	BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/>	CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/>	DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/>	TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, préciser : Nature, N° et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRE
DE L'AVIS DOCUMENTAIRE *☐ OUI☒ NONSI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE, IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
D'AVIS DOCUMENTAIRE *☐ OUI☐ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

19. AVR. 1994

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

94 04661 -

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

19 AVR. 1994

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**ERNEST GUTMANN-
YVES PLASSERAUD S.A.
3 rue Chauveau-Lagarde
75008 PARIS (France).**

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

B2453 - EG

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

44.51.18.00

7 TITRE DE L'INVENTION

**PROTEINES RECOMBINANTES DE L'HEMAGGLUTININE FILAMENTEUSE DE BORDETELLA,
NOTAMMENT BORDETELLA PERTUSSIS, PROCÉDE POUR LEUR PRODUCTION ET LEURS
APPLICATIONS A LA PRODUCTION DE PROTEINES ÉTRANGÈRES OU DE PRINCIPES
ACTIFS VACCINANTS.**

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN.

1) **INSTITUT PASTEUR**

Fondation privée reconnue d'utilité publique

2) **INSTITUT PASTEUR DE LILLE**

Fondation privée reconnue d'utilité publique

3) **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE - Etablissement public**

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

1) 25-28 rue du Dr. Roux - 75724 PARIS CEDEX 15

2) 1 rue du Professeur Calmette - B.P. 245 - 59019 LILLE CEDEX

3) 101 rue de Tolbiac - 75654 PARIS CEDEX 13

PAYS

FRANCE

FRANCE

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

Françaises

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR *☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT* OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES *☐ OUI☐ NON

DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

D'AVIS DOCUMENTAIRE

DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

DE REVENDICATION (à partir de la 110)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE**ERNEST GUTMANN - YVES
PLASSERAUD S.A.
FLORENCE LAZARD
N° 92-4029**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Division Administrative des Brevets

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)
B2453 EG

N° d'enregistrement national

94 04661

Titre de l'invention :

PROTEINES RECOMBINANTES DE L'HEMAGGLUTININE FILAMENTEUSE DE BORDETELLA, NOTAMMENT BORDETELLA PERTUSSIS, PROCEDE POUR LEUR PRODUCTION ET LEURS APPLICATIONS A LA PRODUCTION DE PROTEINES ETRANGERES OU DE PRINCIPES ACTIFS VACCINANTS.

Le (s) soussigné (s)

**ERNEST GUTMANN-
YVES PLASSERAUD S.A.
3 rue Chauveau-Lagarde
75008 PARIS (France).**

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- 1) LOCHT Camille
14 rue du Vert Pré - 59830 WANNEHAIN**
- 2) RENAULD Geneviève
24 rue du Commandant Ayasse - 69007 LYON**
- 3) CAPRON André
58 rue du Capitaine Jasmin - 59113 CHALEMPIN**
- 4) RIVEAU Gilles
22 avenue Salomon - 59800 LILLE**
- 5) MENOZZI Franco
29 rue des Canadiens
B-7022 MONS - HYON (Belgique)**

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le **21 avril 1994**

Ernest GUTMANN - n° 92-1106

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
3, 8, 10, 13, 17 et planches:				11/08/94	1 SEP 1994 G.I.
1/14, 2/14,					
6 à 11/14					

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

**PROTEINES RECOMBINANTES DE L'HEMAGGLUTININE
FILAMENTEUSE DE BORDETELLA, NOTAMMENT BORDETELLA
PERTUSSIS, PROCEDE POUR LEUR PRODUCTION ET LEURS
APPLICATIONS A LA PRODUCTION DE PROTEINES ETRANGERES
OU DE PRINCIPES ACTIFS VACCINANTS**

OBJETS DE L'INVENTION

Grâce à la technologie du génie génétique, il est, en principe, désormais possible d'exprimer n'importe quel gène dans un organisme hétérologue afin de disposer d'une quantité illimitée d'une protéine donnée à des fins industrielles ou de recherche. Les micro-organismes sont très souvent utilisés comme hôtes pour l'expression hétérologue.

Paradoxalement, malgré les progrès considérables observés durant les vingt dernières années, un des problèmes qui ont freiné l'exploitation industrielle des protéines recombinantes est lié à la difficulté de purification de ces molécules qui se trouvent généralement concentrées dans l'organisme qui les synthétise. La purification des protéines recombinantes pourrait être considérablement simplifiée si celles-ci étaient sécrétées dans le milieu de culture. La manipulation génétique d'une micro-organisme pour qu'il sécrète une protéine recombinante nécessite la connaissance des mécanismes moléculaires qui régissent les voies métaboliques de sécrétion. Ces mécanismes sont particulièrement complexes chez les bactéries gram négatives, où toute protéine sécrétée doit traverser deux membranes lipidiques avant d'atteindre le milieu extracellulaire. Par conséquent, les bactéries gram négatives ne sécrètent que peu de protéines.

La sécrétion de protéines est plus simple chez les bactéries gram positives du fait que celles-ci ne possèdent qu'une seule membrane lipidique. Malheureusement, ces micro-organismes produisent généralement aussi des protéases extracellulaires, néfastes pour les protéines recombinantes. La construction de bactéries gram positives déficientes en protéases a par conséquent été un important domaine d'investigation. Cependant, cette tâche s'est avérée difficile, car ces micro-organismes sécrètent souvent de multiples protéases, et la délétion des gènes codant pour ces protéases diminue la viabilité des souches et, par conséquent, leur utilité pour l'expression des gènes hétérologues. Idéalement, il faudrait donc utiliser des bactéries gram négatives ne produisant pas ou peu de protéases extracellulaires et possédant un mécanisme de sécrétion très efficace.

L'invention met à double profit les capacités des Bordetella, et plus particulièrement de B.pertussis qui ne semble pas produire de protéases extracellulaires et de l'aisance avec laquelle peuvent être isolées les hémagglutinines filamenteuses de celles des Bordetella qui en synthétisent pour, entre autre, remédier aux difficultés sus-mentionnées.

Bordetella pertussis, l'agent étiologique de la coqueluche, est une bactérie gram négative qui produit et sécrète plusieurs protéines de taille importante, dont la toxine coquelucheuse (environ 107 kDa) et l'hémagglutinine filamenteuse (FHA; environ 220 kDa). La FHA est le produit majeur de sécrétion, elle est facilement détectable par coloration au bleu de Coomassie après électrophorèse du surnageant de culture.

La FHA est une protéine de 220 kDa produite et sécrétée par B.pertussis. Elle est l'adhésine majeure et le produit de sécrétion majeur de cet organisme

(pour revue voir Locht, C. Bertin, P., Menozzi, F.D., et Renauld, G. (1993) *Mol. Microbiol.* 9, 653-660). Le gène de structure de la FHA, appelé fhaB, a été cloné dans plusieurs laboratoires (Brown, D.R., et Parker, C.D. (1987) *Infect. Immun.*, 55, 154-161 ; Relman, D.A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R., et Falkowo, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 2637-2641 ; Delisse-Gathoye, A.-M., Locht, C., Jacob, F., Raaschou-Nielsen, M., Heron, I., Ruelle, J.-L., DeWilde, M., et Cabezon, T. (1990) *Infect. Immun.* 58, 2895-2905) et code pour un précurseur d'environ 367 kDa (Delisse-Gathoye et al., 1990 ; Domenighini, M., Relman, D., Capiou, C. Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V., et Rappuoli, R. (1990) *Mol. Microbiol.* 4, 787-800). La partie N-terminale de ce précurseur correspond à la partie mature de la FHA et la partie C-terminale est perdue lors de la maturation et/ou sécrétion de la protéine.

En amont du gène fhaB se trouve un opéron polycistronique responsable à la fois de la biogenèse de la FHA et des fimbriae, aussi appelées agglutinogènes (Locht, C. Geoffroy, M.C., et Renauld, G. (1992) *EMBO J.* 11, 3175-3183). Cet opéron contient quatre cistrons dont les produits des trois premiers sont homologues aux protéines accessoires et à l'adhésine de pili de plusieurs bactéries gram négatives (Locht et al., 1992) et impliqués dans la biogenèse des fimbriae de B.pertussis, et dont le produit du dernier est homologue à ShlB et HpMB et est impliqué dans la biogenèse de la FHA (Willems, R.J.L., Geuijen, C., van der Heide, H.G.J., Renauld, G., Bertin, P. van den Akker, W.M.R., Locht, C., et Mooi, F.R. (1994) *Mol. Microbiol.* 11, 337-347).

Par ailleurs, la région N-terminale de la FHA est homologue aux régions N-terminales des hémolysines ShlA et HpMA de Serratia marcescens et Proteus

mirabilis, respectivement (Delisse-Gathoye et al., 1990). Ces hémolysines sont sécrétées chez ces deux microorganismes et la sécrétion implique l'interaction du produit du gène *shlB* ou *hpmB* avec la région N-terminale de *ShlA* et *HpmA*, respectivement (Braun, V. Ondraczed, R., et Hobbie, S. (1993) Zbl. Bakt. 278, 306-315). Des expériences de mutagenèse du gène *fhaB* ont montré que la région N-terminale de la FHA, homologue aux *ShlA* et *HpmA*, est également importante pour la biogenèse de la FHA (Willems et al., 1994) suggérant donc par analogie avec les systèmes de sécrétion des hémolysines, que le produit du gène *fhaC* interagit avec la région N-terminale et que cette interaction est importante dans le processus de biogenèse de la FHA. Les protéines *HpmB*, *ShlB* et *FhaC* sont vraisemblablement des protéines de la membrane externe (Braun et al., 1993 ; Willems et al., 1994) et jouent un rôle dans la sécrétion des hémolysines et de la FHA, respectivement, au travers de la membrane externe. Chez *B.pertussis*, un blocage de la sécrétion au travers de la membrane externe conduit à la dégradation rapide de la protéine.

La FHA est une adhésine majeure de *B.pertussis* et exprime au moins trois types d'activités de liaison (voir Loch et al., 1993). Relman et al. (Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D., Saukkonen, K., et Wright, S. (1990) Cell 61, 1375-1382) ont montré qu'une séquence RGD dans la FHA mature est responsable de l'interaction de cette molécule avec l'intégrine CR3 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) des macrophages. Cette interaction induit l'internalisation des *B.pertussis* dans les macrophages où ces organismes peuvent survivre.

La FHA peut également interagir avec des glycoconjugués et le domaine de reconnaissance des carbohydrates a été identifié par Prasad et al.

(Prasad, S. M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E. I., et Masure, R. (1993) *Infect. Immun.* 61, 2780-2785) dans la région 1141 à 1279 de la FHA, un peu en aval du site RGD. Menozzi et al. (Menozzi, F.D., Gantiez, C., et Locht, C. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* 78, 59-64) ont montré que la FHA exprime une affinité pour l'héparine et peut être purifiée par chromatographie sur héparine-sépharose à partir de surnageant de culture de B.pertussis. Cette interaction avec des glycosaminoglycans sulfatés semble jouer un rôle dans l'interaction des microorganismes avec les cellules épithéliales (Menozzi, F.D., Mutombo, R., Renauld, G., Gantiez, C., Hannah, J.H., Leininger, E., Brennan, M.J. et Locht, C. (1994) *Infect. Immun.* 62, 769-778).

La FHA est un bon immunogène pour l'induction d'IgAs dans les voies respiratoires chez le patient infecté par B.pertussis (Zackrisson, G., Lagergard, T., Trollfors, B., et Krants, I. (1990) *J. Clin. Microbiol.* 28, 1502-1505) et la présence d'IgAs est détectable encore longtemps après l'infection (Zackrisson, G., Arminjon, F., Krantz, I., Lagergard, T., Sigurs, N., Taranger, J. et Trollfors, B. (1988) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7, 764-770). Une réponse immune de longue durée contre la FHA peut également être observée chez la souris expérimentalement infectée avec B.pertussis par voie nasale (Amsbaugh, D.F., Li, Z.-M., et Shahin, R.D. (1993) *Infect. Immun.* 61, 1447-1452). Une bonne réponse immune (à la fois IgAs et IgG) contre la FHA peut aussi être obtenue dans les voies respiratoires de la souris après vaccination intra-nasale avec la FHA purifiée (Shahin, R.D., Amsbaugh, D.F., et Leef, M.F. (1992) *Infect. Immun.* 60, 1482-1488 ; Cahill, E.S., O'Hagan, D.T., Illum, L., et Redhead, K. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 211-216). Il est possible que l'une ou plusieurs des activités de liaison

exprimées par la FHA soi(en)t responsable(s) de l'immunogénicité mucosale de cette molécule.

L'invention met à profit le mécanisme moléculaire de sécrétion de la FHA de Bordetella, notamment de B.pertussis pour la production de protéines ou peptides recombinants hétérologues de ces organismes.

Dans l'une de ces premières applications, l'invention permet, notamment dans les conditions qui seront décrites plus loin, la sécrétion de ces peptides recombinants hétérologues dans le milieu hétérologue de culture et, le cas échéant, la récupération de la partie hétérologue de ce peptide recombinant, lorsque celui-ci constitue le produit finalement recherché. Mais une autre variante de l'invention a pour objectif l'exposition du peptide recombinant à la surface de cellules procaryotes, notamment à des fins de vaccination.

La fusion de protéines ou peptides hétérologues avec la FHA peut, en effet avoir une application particulièrement intéressante dans le domaine de la vaccination. En effet, la FHA est capable de stimuler une réponse immunitaire mucosale importante et de longue durée après infection naturelle chez l'homme ou immunisation intranasale. Cette propriété est probablement due aux activités spécifiques d'attachement de la FHA aux muqueuses. Une fusion traductionnelle de la FHA avec un antigène pourrait donc faciliter la présentation de cet antigène au niveau des muqueuses nasales en vue de la production d'immunoglobulines sécrétoires (IgAs). Une telle stratégie est particulièrement intéressante pour une vaccination contre certaines maladies respiratoires et, lorsque le système immunitaire mucosal des voies respiratoires communique avec celui des autres muqueuses ou plus généralement d'autres cellules : cellules épithéliales, macrophages, etc..., ce

principe peut s'élargir à de nombreuses autres maladies infectieuses contre lesquelles il est important de développer une immunité mucosale. Un tel type de vaccin peu onéreux pourrait facilement s'administrer par une vaporisation nasale. Cette voie de vaccination éliminerait donc le trauma causé par injection ainsi que le risque de destruction des vaccins oraux dans l'environnement acide de l'estomac.

Il est fait référence dans ce qui suit, aux dessins dont les légendes sont indiquées à la fin de cette description.

L'invention concerne tout d'abord l'ADN recombinant contenant une séquence (1) codant pour un polypeptide hétérologue vis-à-vis d'une FHA de B.pertussis fusionnée dans le même cadre de lecture à une séquence (2) placée en amont de la première, cette séquence (2) codant au moins pour la région N-terminale de la protéine mature de FHA qui, lorsque celle-ci est elle-même placée sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases cellulaires de B.pertussis et introduite dans une culture de B.pertussis, est exprimée dans cette culture sous le contrôle de ce promoteur et excrétée dans le milieu de culture.

Dans l'un des cas extrêmes, la séquence (2) de l'ADN recombinant susdit code pour la totalité du précurseur de la FHA, par exemple celle de B.pertussis (parfois désignée sous l'abréviation FHAb). L'incorporation de cet ADN recombinant sous forme de plasmide notamment et sous le contrôle du promoteur adéquat dans une cellule B.pertussis conduit alors à l'expression de la protéine recombinante correspondante, dont une partie est excrétée complètement dans le milieu de culture, l'autre traversant également la membrane de B.pertussis, mais y restant attachée. Dans ce dernier cas, il sera vu

dans ce qui suit, que la protéine recombinante, y incluse la séquence en acides aminés correspondantes aux polypeptides hétérologues se trouve exposée à la surface de ces cellules.

La protéine excrétée dans le milieu de culture peut être davantage purifiée, notamment par un procédé consistant à mettre en contact le milieu de culture avec l'héparine immobilisée sur un support insoluble pour former un complexe héparine-FHA, la protéine recombinante pouvant alors être récupérée par dissociation du complexe.

Dans la suite de cet exposé, il sera vu que les premiers essais ont été effectués dans une souche B.pertussis BGR4 dont la partie la plus importante de la phase de lecture du gène fhaB et son promoteur avaient été délétés du chromosome par deux éléments successifs de recombinaison homologues. L'ADN recombinant contenait un fragment EcoRI d'environ 10 kb isolé à partir d'un clone qui avait été entièrement séquencé, notamment par Delisse-Gathoye et al., 1990. C'est par rapport à la séquence décrite par ces auteurs que sont précisées dans le corps du présente texte, les positions relatives de certains des nucléotides dans le chromosome B.pertussis correspondant, le premier site d'EcoRI E^a correspondant à la position 1, et le second site E^b occupant alors la position 1035.

L'ATG d'initiation de la traduction se trouve en aval du site E^a (l'un des trois ATG aux positions respectivement 253, 298, 427) le promoteur correspondant étant intercalé entre le site E^a et l'ATG d'initiation pertinent. Le précurseur s'étend jusqu'au delà de la position du site E^b (position 1125).

Comme cela sera décrit de façon plus détaillée dans les exemples, plusieurs ADNs recombinants ont été

produits, lesquels comportaient notamment des séquences s'étendant toutes entre le nucléotide 1 et respectivement le nucléotide 10035 (BPGR41), 6292 (BPGR413), 5215 (BPGR48), 2841 (BPGR44), 1575 (BPGR412) et enfin 907 (BPGR415). Des sites de restriction correspondants sont indiqués dans la figure 2C.

Les observations qui ont été faites quant à l'expression de ces fragments de tailles décroissantes, avant que ceux-ci n'aient été recombinés avec une séquence codant pour un polypeptide hétérologue, étaient les suivantes. Comme il résulte des figures 2A et 2B, on obtenait une excrétion importante du peptide codé par le peptide BPGR41, excrétion qui allait se réduire pour les fragments contenus dans les plasmides BPGR413 et BPGR48, qui ne contenaient plus que la séquence codant pour la presque totalité de la protéine mature (BPGR413) et une séquence tronquée codant pour un polypeptide également tronqué (BPGR48). Ces observations se trouvent reflétées par les essais illustrés dans la figure 2B dans lesquels les produits d'expression ont été détectés par des anticorps polyclonaux de rats anti-FHA. Mais dans ce test, on constate l'absence d'expression détectable pour les plasmides contenant des séquences plus courtes. L'on constate au contraire dans un autre système de mesure (coloration au bleu de Comassie : figure 2A) une recrudescence de l'expression avec le plasmide BPGR44. Sans qu'il y ait à y voir une relation nécessaire de correspondance, on constate que la partie reconnue par la majeure partie des anticorps polyclonaux de la séquence FHA n'est pas nécessaire à la production d'une excrétion dans le système qui a été utilisé. Lorsqu'est raccourcie davantage la séquence tronquée de FHA, on constate de nouveau une réduction de

l'excrétion. Ainsi, le fragment contenu dans le plasmide BPGR412 est-il encore exprimé à un moindre degré, même si aucune bande n'est observée sur la figure 2 pour la piste d'électrophorèse sur gel correspondante au plasmide BPGR412. Mais, la mise en contact d'une culture correspondante avec l'héparine immobilisée a permis d'isoler une fraction excrétée reconnue par des anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement la région N-terminale de la FHA.

Il apparaît que des séquences (2) entrant dans les ADNs recombinants selon l'invention doivent, en tout état de cause, comporter des signaux d'excrétion de la séquence codant pour la FHA et la région N-terminale homologue aux régions N-terminales des hémolysines Sh1A et HbnA de Serratia marcescens et Proteus mirabilis.

Pour la mise en oeuvre de l'une des applications préférées de l'invention, à savoir la production d'un peptide hétérologue et sa récupération à partir du milieu de culture, il apparaît par conséquent que l'extension de la séquence (2) à partir de l'extrémité N-terminale de la FHA vers son extrémité C-terminale sera choisie de façon à ne pas aller au delà de la longueur qui ferait que la transformation de B.pertussis avec cet ADN recombinant alors placé sous le contrôle d'un promoteur susceptible d'être reconnu par B.pertussis ne permettrait plus l'excrétion directe de la protéine recombinante alors formée dans le milieu de culture de ce B.pertussis.

Dans le cadre de cette application, un ADN recombinant préféré est caractérisé en ce que la séquence (2) s'étend entre l'ATG correspondant au codon d'initiation de la traduction de la FHA à un nucléotide C-terminal au delà du nucléotide 907 dans la direction de la traduction et de préférence non au delà de la position 6922.

Sans que ce test soit décisif, il peut encore être affirmé qu'un ADN recombinant préféré sera celui qui est caractérisé par le fait qu'il ne réagit plus que faiblement avec des anticorps anti-FHA plus particulièrement dirigés contre les épitopes de la partie C-terminale de la FHA mature, situés au delà du site nucléotidique 2841 dans le sens de la traduction.

Il va de soi que la séquence recombinante reprenant les séquences (1) à et (2) peut être réalisée de toute façon en soi connue, en fonction du but final que l'on se sera donné. Eventuellement, la séquence (1) codant pour le peptide hétérologue se trouvera encadrée par des régions courtes codant pour des peptides pré-définis formant des sites de clivage spécifiques d'enzymes protéolytiques elles-mêmes spécifiques, ce grâce à quoi la partie hétérologue du polypeptide recombinant peut aisément être séparée à partir de celui-ci.

Dans une autre application avantageuse de l'invention, le peptide recombinant est susceptible d'être utilisé comme principe vaccinant, la séquence peptidique hétérologue étant douée des propriétés immunogènes choisies au préalable et, de préférence, la partie dérivée de la protéine mature de FHA comportant l'un au moins des sites spécifiques d'attachement de la FHA à des muqueuses ou de façon plus générale à d'autres cellules eucaryotes, notamment à des cellules épithéliales ou des macrophages.

L'utilisation de l'ADN recombinant pour la production de polypeptide hétérologue peut être envisagée dans des cellules procaryotes autres que Bordetella pertussis ou même que plus généralement des Bordetella. Il est en effet rappelé que Stibitz, Weiss et Falkow ont rapporté des ADNs de Bordetella contenant la séquence codant pour le précurseur de la

FHA et l'ensemble des gènes de régulation, y inclus le gène fhaC, c'est-à-dire le gène auxiliaire dont le produit d'expression est également nécessaire à l'expression de la FHA, pouvaient, quand ils étaient transportés dans E.coli d'être exprimés et exposés à la surface des bactéries E.coli transformées (J.of Bacteriology (1988) 170, 2904-2913).

Il va de soi que l'invention concerne donc toutes les cultures cellulaires dans lesquelles la FHA peut être exprimée. L'invention concerne donc plus particulièrement les cultures de cellules appartenant à une espèce Bordetella, notamment B.pertussis, dès lors que ces cellules sont également porteuses du gène FHAc exprimable dans ces cellules.

L'invention concerne encore les cultures cellulaires transformées, appartenant à des espèces autres que Bordetella, dès lors qu'elles contiendraient également une séquence codant pour au moins la partie de la FHAc nécessaire à l'expression de la séquence (2) sous une forme également exprimable au sein des cellules de cette culture.

Il est rappelé que Willems et al. (1994) Mol. Microbiol. 11, 337-347 ont séquencé entièrement une séquence codant pour la protéine FHAc.

Il va également de soi que l'invention n'est pas limitée à des ADNs recombinants contenant une séquence codant pour la FHA de B.pertussis. Celle-ci peut être remplacée par toute séquence correspondante isolable à partir d'autres Bordetella, qu'il s'agisse de Bordetella infectieuses pour l'homme, notamment B.parapertussis ou B.bronchiseptica, ou encore pour des Bordetella infectieuses pour des animaux, notamment les Bordetella bronchiseptica infectieux pour le chien ou le porc.

L'invention n'est nullement limitée aux ADNs recombinants dont les séquences (2) sont restreintes à

des séquences tronquées de l'ADN codant pour une FHA de Bordetella. Comme cela a été vu plus haut, l'invention concerne également les ADNs recombinants contenant des séquences (2) plus longues, chaque fois que sera au contraire recherchée la production de cellules procaryotes, notamment de bactéries portant, exposé à leur surface, le produit d'expression de l'ADN recombinant susdéfini. La séquence hétérologue (1) peut soit être incorporée à l'intérieur même de la séquence codant pour FHA, voire même FHAb, soit être fusionnée à la FHA mature ou le précurseur avec conservation du code de lecture correspondant.

Dans le cas où la cellule hôte, le cas échéant, après atténuation ou inactivation, peut être utilisée comme support de vaccin, on apprécie que l'invention fournit de nouvelles variétés vaccinales comportant des cellules procaryotes de ce type pourtant exposées à leur surface le produit d'expression de l'ADN recombinant. Avantageusement, seront exposés à la surface des bactéries en cause, à la fois la séquence en acides aminés correspondante aux sites antigéniques du peptide hétérologue, d'une part, et l'un des sites d'adhésion de la protéine FHA aux muqueuses ou encore à d'autres cellules eucaryotes, telles que des cellules épithéliales ou des macrophages.

A titre d'exemples de technique pouvant être utilisés pour obtenir cette orientation convenable, on fera référence au brevet européen n°0242243 déposé le 06/03/87.

Alors que dans le cas de la production in vitro d'une protéine ou d'une polypeptide recombinant, l'on pouvait avoir des cellules procaryotes transformées par un plasmide, il apparaît que pour la réalisation de bactéries porteuses du produit d'expression de l'ADN recombinant à leur surface, il est préférable que celui-ci ait été incorporé sous le contrôle du

promoteur approprié à l'ADN chromosomique desdites cellules. Toutes techniques connues à cet effet peuvent être mises en oeuvre, telles que les techniques de recombinaison homologue.

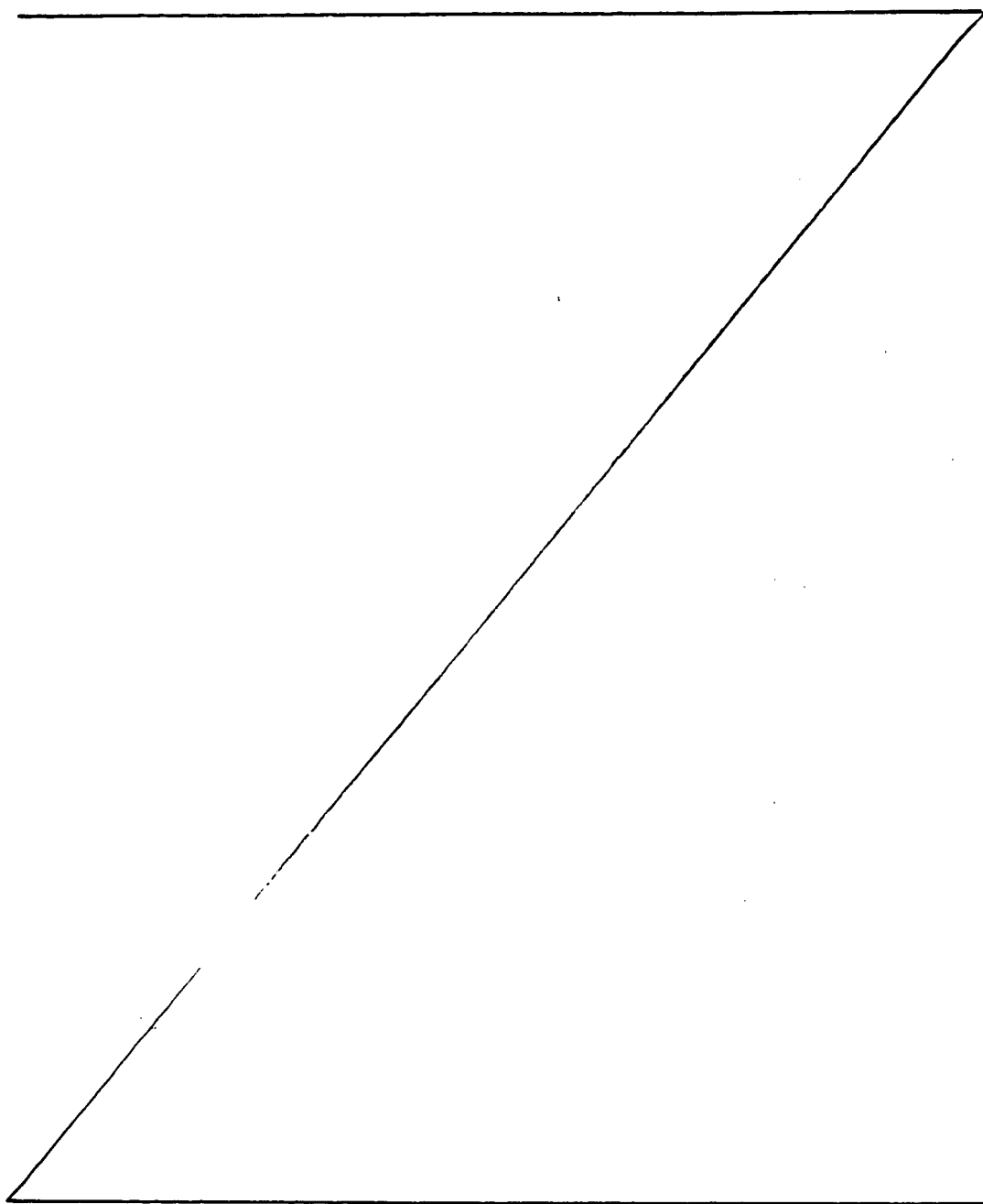
Il va de soi que la séquence (1) peut coder pour toutes séquences antigéniques souhaitées, qu'il s'agisse d'antigènes de Bordetella, de Shigella, de Neisseria, de Borrellia, etc... de toxines ou toxoïdes diphtériques, tétaniques ou colériques, d'antigènes viraux, notamment de l'hépatite B, de l'hépatite C, du polyovirus ou de HIV, d'antigènes parasitaires tels que des plasmodium, des Shistozoma, des toxoplasmes, etc... Il s'agit là évidemment d'exemples qui n'ont aucun caractère limitatif.

De même, les hôtes cellulaires peuvent être constitués par toutes bactéries atténuées ou inactivées, telles que des shigelles atténuées, des E.coli atténués ou des salmonelles atténuées.

Mais, on l'a vu, tout FHA de Bordetella peut être mis en oeuvre. Partant d'une séquence codant pour l'une d'entre elles, on sait que l'on peut détecter des séquences correspondantes contenues dans l'ADN chromosomiques d'autres Bordetella, par exemple à l'aide de sondes appropriées.

L'invention présente un intérêt tout particulier pour la constitution de compositions immunogènes et vaccinales, destinées à l'administration par mise en contact de muqueuses, notamment pour l'administration par voies nasales. L'invention est donc d'un intérêt tout particulier pour la prévention d'infection des voies respiratoires ou de tissus susceptibles d'être atteints par ces voies. Les compositions du genre en question peuvent se présenter sous forme d'aérosol, administrables notamment par voies nasales. L'invention s'intéresse à la vaccination aussi bien humaine que vétérinaire.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit, des constructions et essais biologiques qui ont été effectués dans le cadre de l'invention et qui lui apporte le soutien expérimental requis.



EXEMPLES

I. Complémentation de la souche *B. pertussis* BPGR4 par un plasmide dérivé de pBBR1 contenant le gène *fhaB*.

Afin de savoir s'il est possible de compléter une mutation chromosomique du gène *fhaB* par un plasmide autorépliquatif, nous avons utilisé la souche *B. pertussis* BPGR4 (Locht *et al.*, 1992), une souche dérivée de la souche sauvage *B. pertussis* Tohama I chez laquelle le fragment *EcoRI* de 10 kb contenant la plupart de la phase de lecture du gène *fhaB* et son promoteur a été délété du chromosome par deux événements successifs de recombinaison homologue. Cette souche ne produit pas de FHA. D'autre part, le fragment *EcoRI* de 10 kb isolé de pRIT13202 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990) et contenant la plupart du gène *fhaB* a été cloné dans le site *EcoRI* du plasmide pBBR122. Ce plasmide est un dérivé de pBBR1 isolé de *Bordetella bronchiseptica* et décrit par Antoine et Locht (Antoine, R., et Locht, C. (1992) *Mol. Microbiol.* 6, 1785-1799). Il contient un fragment *HhaI* de 1364 pb provenant de pBR328 (Soberon, X., Covarrubias, L., et Bolivar, F. (1980) *Gene* 9, 287-305) et conférant la résistance au chloramphénicol inséré dans le site *PvuI*, ainsi que le gène commercial (Pharmacia) conférant la résistance à la kanamycine inséré au site *AvaI* en position 1388.

La digestion de pBBR122 par *EcoRI* et l'insertion du gène *fhaB* sous forme du fragment *EcoRI* de 10 kb inactive le gène de résistance au chloramphénicol mais maintient la résistance à la kanamycine. Le plasmide recombinant a été appelé pBG1 et a été introduit dans *B. pertussis* BPGR4 par électroporation. Cette nouvelle souche de *B. pertussis* est appelée *B. pertussis* BPGR41. L'analyse des surnageants de culture de *B. pertussis* BPSM, un dérivé Sm^R de la souche Tohama I (Menozzi *et al.*, 1994), de *B. pertussis* BPGR4 et de *B. pertussis* BPGR41 par électrophorèse en SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) et coloration au bleu de Coomassie (Fig. 1) ainsi que par Western blot en utilisant des anticorps polyclonaux de rat spécifiques à la FHA montrent que pBG1 peut efficacement compléter la mutation *fhaB* de *B. pertussis* BPGR4.

II. Délétions progressives de la région C-terminale de FhaB.

Le produit primaire du gène *fhaB*, i. e. le précurseur de la FHA, est appelé FhaB. Puisque la région N-terminale homologue aux hémolysines ShlA et HpmA est importante pour la biogenèse de la FHA (Willems *et al.*, 1994), il était important d'investiguer le rôle de la région C-terminale de FhaB dans la biogenèse de la FHA. Plusieurs délétions de la région C-terminale ont été obtenues : pBG13 est le résultat de l'échange du fragment *SphI/BamHI* de 2.5 kb de pBG4 par le fragment *SphI/BglII* de 6 kb de pRIT13202 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990); pBG8 est le résultat de l'insertion du fragment *BamHI* de 4.7 kb dans pBG4 digéré par *BamHI*; pBG4 est le résultat de la digestion de pBG1 par *BamHI* et de sa religation, ce plasmide a donc perdu les deux fragments *BamHI* de 4.7 kb et de 2.37 kb; pBG12 est le résultat de l'échange du fragment *SphI/BamHI* de 2.5 kb de pBG4 par le fragment *SphI/BamHI* de 1.27 kb de pUC18-3, pUC18-3 a été généré en échangeant le fragment *SphI/SalI* de 15 pb de pUC18 par le fragment *SphI/SalI* de 1.27 kb de pRIT13197 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990); pBG15 est le résultat de la religation des deux fragments *PvuI* de 3.65 kb et 2.76 kb après digestion de pBG4 par *PvuI*, générant ainsi la délétion du fragment *PvuI* de 1.9 kb. Les plasmides pBG13, pBG8, pBG4, pBG12 et pBG15 ont été introduits dans *B. pertussis* BPGR4 par électroporation ce qui a généré les souches *B. pertussis* BPGR413, BPGR48, BPGR44, BPGR412 et BPGR415, respectivement.

Les surnageants de culture de ces différentes souches ont été analysés par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie ainsi que par Western blot en utilisant des anticorps polyclonaux de rat anti-FHA. Les résultats sont montrés dans la figure 2 et indiquent que par rapport à la souche *B. pertussis* BPSM et la souche *B. pertussis* BPGR41, les souches BPGR413 et BPGR48 produisent beaucoup moins de FHA dans le surnageant de culture. Par contre, la souche BPGR44 produit plus de FHA tronquée et sécrétée que la souche BPSM ou la souche BPGR41. Les souches BPGR412 et BPGR415 produisent à nouveau moins de FHA tronquée que la souche BPGR44, bien que la FHA tronquée produite par BPGR412 est clairement visible dans le surnageant de culture. Ces expériences montrent l'importance de la région C-terminale de FhaB dans la

biogénèse et/ou sécrétion de la FHA mature, mais ils montrent aussi qu'une FHA tronquée (par exemple chez la souche BPGR44) peut être très efficacement sécrétée en absence de la région C-terminale de FhaB.

III. Importance de *fhaC* dans la biogénèse de la FHA tronquée codée par pBG4 et sécrétion chez *Bordetella parapertussis*

Puisque *B. pertussis* BPGR44 sécrète très efficacement la FHA tronquée, il était important de savoir si cette sécrétion était toujours dépendante du produit du gène *fhaC*. pBG4 a donc été introduit dans la souche *B. pertussis* BPMC (Locht et al., 1992). Cette souche est caractérisée par une délétion chromosomique du gène *fhaB* total et de la région intergénique entre *fhaB* et les gènes auxiliaires en aval, y compris *fhaC*. Elle n'exprime donc ni *fhaB*, ni *fhaC*, ni les gènes *fimBCD* (aussi appelés *fhaDAE*). Les analyses par SDS-PAGE/coloration au bleu de Coomassie des surnageants de culture de la souche *B. pertussis* BPMC (pBG4), appelée BPMC4, montrent que cette souche ne produit pas de FHA tronquée extracellulaire. Ces résultats (Fig. 3) montrent donc que l'expression du gène *fhaC* est nécessaire à la production extracellulaire de la région N-terminale de la FHA. L'importance de la région N-terminale de la FHA homologue aux hémolysines ShlA et HpmA (Delisse-Gathoye et al., 1990) pour la sécrétion de la FHA tronquée a été étudiée en générant la souche *B. pertussis* BPGR47. Cette souche est un dérivé de BPGR4 transformé avec pBG7. Ce plasmide est le résultat de l'échange du fragment *SphI/BamHI* de 2.5 kb de pBG4 par le fragment *SphI/BamHI* de pUC18-5, qui est lui-même le résultat de l'insertion du fragment *SalI/BamHI* d'environ 1.27 kb du pRIT13120 (Delisse-Gathoye et al., 1990) dans pUC18-4 digéré par *SalI* et *BamHI*. Le plasmide pUC18-4 est le fruit de la digestion de pUC18-3 par *PstI* et de la religation sur lui-même. Cette construction délète en phase un fragment *PstI* d'environ 460 pb codant pour la région de la FHA qui est homologue aux hémolysines ShlA et HpmA. L'analyse de la souche BPGR47 par électrophorèse et Western blot (Fig. 3) montre que la région homologue est également nécessaire à la sécrétion de la FHA tronqué, comme à celle de la FHA complète.

Afin de savoir si la FHA tronquée pouvait être produite et sécrétée par d'autres espèces du genre *Bordetella*, pBG4 a été introduit dans *Bordetella parapertussis* PEP (Nordmann, P., François, B., Menozzi, F. D., Commare, M. C., et Barois, A. (1992) *Ped. Infect. Dis. J.* 11, 248). Le surnageant de culture de la souche transformée a été analysé par SDS-PAGE et le résultat (Fig. 3) indique que *B. parapertussis* peut également sécréter la région N-terminale de la FHA de *B. pertussis*, ce qui suggère que *B. parapertussis* exprime également un gène auxiliaire qui correspond à *fhaC*.

Finalement, pBG4 a été introduit dans la souche *B. pertussis* BPSM et l'analyse du surnageant de culture de la souche *B. pertussis* BPSM (pBG4), appelée *B. pertussis* BPSM4, montre que la production et la sécrétion de la FHA tronquée n'affecte pas la production et la sécrétion de la FHA naturelle et vice versa (Fig. 3). Le système de sécrétion ne semble donc pas être saturé par l'expression du gène *fhaB*.

IV. Identification du site de fixation à l'héparine et purification de la FHA tronquée sur héparine-sépharose.

La FHA de *B. pertussis* peut interagir avec l'héparine et être purifiée sur héparine-sépharose (Menozzi *et al.*, 1991). Afin de savoir si cette interaction implique un site différent de celui qui est responsable de la liaison de la FHA aux intégrines CR3 (Relman *et al.*, 1990) ou de celui responsable de la liaison de la FHA à d'autres glycoconjugués (Prasad *et al.*, 1993), différents fragments d'ADN recouvrant ensemble la totalité de la région de *fhaB* qui code pour la FHA mature ont été exprimés en fusion avec MalE (une "maltose-binding protein") en utilisant le système d'expression commercialisé par New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Les différents fragments exprimés en fusion avec le gène codant pour MalE sont montrés dans la figure 4. Toutes les protéines de fusion ont été purifiées par chromatographie sur résine d'amylose au départ d'un lysat total obtenu après sonication d'environ 600 ml de culture de *Escherichia coli* TG1 transformé par les différents plasmides recombinants.

Les protéines recombinantes purifiées sur amylose ainsi que MalE et la FHA purifiée ont été chromatographiées sur 3 ml d'héparine-sepharose équilibrés avec 100 ml

PBS ("Phosphate Buffered Saline"). 40 ml des différents échantillons ont été préalablement ajustés à une concentration de 5 µg/ml dans PBS + 5 mM maltose, déposés sur la colonne d'héparine sépharose et lavés avec PBS + 5 mM maltose. Les protéines fixées ont alors été éluées avec PBS + 0.5 M NaCl. La quantité des protéines dans la fraction retenue et éluee avec PBS + 0.5 M NaCl et celle des protéines non retenues ont été comparées à celle des protéines totales déposée sur la colonne. L'analyse par SDS-PAGE des différentes fractions a été utilisée pour confirmer que les protéines correspondent bien aux polypeptides de fusion attendus. Les résultats indiquent que seulement le fragment 2 (Fig. 4) code pour un polypeptide qui est significativement retenu sur héparine-sépharose. Puisque le fragment 1 (Fig. 4) ne code pas pour un polypeptide retenu sur héparine-sépharose et puisque ce fragment recouvre partiellement le fragment 2, ceci suggère que la région de la FHA qui interagit avec l'héparine est localisée entre les résidus 441 et 863 si l'on considère la numérotation proposée par Delisse-Gathoye *et al.* (1990). Cette région contient la plupart des "A repeats" et deux "B repeats" (Locht *et al.*, 1993) suggérant que l'un ou plusieurs de ces "repeats" pourraient être responsables de la liaison entre la FHA et l'héparine.

La FHA tronquée produite et sécrétée par la souche *B. pertussis* BPGR44 contient la totalité de la région codée par le fragment 2 (Fig. 4) et devrait donc se lier à l'héparine. Le surnageant de culture de cette souche a donc été chromatographié sur héparine-sépharose et élué avec PBS + 0.5 M NaCl. L'analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie des différentes fractions protéiques montre que la totalité de la FHA tronquée produite et sécrétée par la souche BPGR44 est retenue sur héparine et peut être purifiée sur héparine-sépharose par une procédure identique à celle utilisée pour la purification de la FHA naturelle (Menozzi *et al.*, 1991).

V. Production et sécrétion de peptides hétérologues en fusion avec la FHA tronquée chez *B. pertussis* et purification sur héparine-sépharose

Le système efficace de sécrétion de la FHA chez *B. pertussis* a ensuite été utilisé afin de sécréter des peptides hétérologues chez cet organisme. Le peptide modèle utilisé

dans cet exemple est celui qui correspond à la région 190-211 de la glutathion-S-transférase de 28 kDa (Sm28GST) de *Schistosoma mansoni* (Xu, C.-B., Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Wolowczuk, I., Tartar, A., et Capron, A. (1993) *J. Immun.* **150**, 940-949). Deux oligonucléotides synthétiques avec la séquence suivante : 5' TAGGATCCGGGCCGGGGCCCCGAAAATCTGTTAGCC 3', et 5' TAAGATCTCCCGGGCCCCGGGAAGGGAGTTGCAGG 3' ont été phosphorylés par des méthodes standard (Sambrook, J., Fritsch, E. F., et Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning : A laboratory Manual*, 2ième édition, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY), et utilisés pour amplifier par PCR la région codant pour le peptide 190-211. Après amplification, le fragment a été digéré par *Bam*HI et *Bgl*III et inséré dans le site *Bam*HI de pBG4. Les plasmides recombinants ont été analysés par restriction afin de savoir l'orientation de l'insert oligonucléotidique. Un plasmide contenant l'insert oligonucléotidique dans le sens de l'expression de la FHA, appelé pNJ1, a ensuite été purifié et a été introduit dans *B. pertussis* BPGR4 par électroporation. Cette souche recombinante est appelée BPNJ1 et son surnageant de culture a été analysé par SDS-PAGE/coloration au bleu de Coomassie et Western blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre le peptide 190/211 de Sm28GST. Les résultats montrés dans la figure 5 indiquent que la souche BPNJ1 sécrète efficacement le peptide 190/211 de Sm28GST en fusion avec la FHA tronquée et que ce peptide garde son antigénicité.

Le surnageant de culture de la souche BPNJ1 a ensuite été chromatographié sur héparine-sépharose en présence de PBS. L'élution a été réalisée dans PBS + 0.5 M NaCl. L'analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie montre que la totalité de la protéine de fusion est retenue sur la colonne et peut être éluée dans PBS + 0.5 M NaCl.

VI. Stabilité de pNJ1 dans *B. pertussis* BPNJ1

Afin de connaître la stabilité de pNJ1 dans *B. pertussis* BPNJ1, la souche a été incubée en milieu solide en absence d'antibiotiques. Après 4 jours d'incubation à 37°C,

20 colonies ont été inoculées sur milieu liquide avec et sans kanamycine. Après 4 jours d'incubation à 37°C, le comptage de colonies résistantes à la kanamycine par rapport à celles qui ne sont pas résistantes à la kanamycine indique que toutes les colonies avaient gardé la résistance, montrant que pNJ1 est stable dans *B. pertussis* BPNJ1 en absence de pression sélective. Le contenu en plasmide de 6 colonies résistantes a été analysé par une méthode rapide d'analyse (Baulard, A., Bertin, P., Dartois, V., et Loch, C. (1994) *Meth. Mol. Cell. Biol.* 4, sous presse) et le résultat montre que toutes les 6 colonies contenaient le plasmide pNJ1.

Cinq souris OF1 ont ensuite été infectées par voie nasale avec *B. pertussis* BPNJ1. Environ 10⁶ cfu ("colony forming units") par souris ont été instillées nasalement. Après 7 jours, les poumons de ces souris ont été prélevés et les *B. pertussis* contenus dans les poumons ont été étalés sur milieu solide avec ou sans kanamycine. Après 4 jours de culture à 37°C, le nombre de bactéries hémolytiques et résistantes à la kanamycine a été comparé au nombre de bactéries hémolytiques et non résistantes à la kanamycine. Le résultat montre qu'environ 95 % des bactéries avaient perdu la résistance à la kanamycine.

Ensemble, ces résultats montrent que pNJ1 est très stable dans *B. pertussis* in vitro mais est relativement instable in vivo.

VII. Construction de la souche *Bordetella pertussis* BPGR5, produisant la Sm28GST de *S. mansoni* en fusion avec la FHA.

Afin de savoir si une protéine hétérologue peut être produite en fusion avec la FHA entière, un fragment contenant l'ADNc complet de la Sm28GST muni de son codon de fin de traduction a été fusionné au cadre de lecture du gène *fhaB* de façon à ce que ce cadre soit interrompu juste derrière l'insertion du gène codant pour la Sm28GST. Un fragment *Bgl*III de 0,68 kb contenant l'ADNc de la Sm28GST a été amplifié par PCR à partir du clone TG10, un dérivé du phage lambda gt10 (Pierce, R., Khalife, J., Williams, D., Kanno, R., Trottein, F., Lepresle, T., Sabatier, J., Achstetter, T., et Capron, A., soumis pour publication) en utilisant les oligonucléotides suivants : 5'

TAAGATCTCCATGGCTGGCGAGCAT 3' et 5' TAAGATCTCCGAGCTTTCTGTTG 3'. Après digestion du fragment amplifié par l'enzyme *Bgl*III il a été cloné dans le plasmide pRIT13202 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990) préalablement digéré par *Bgl*III et déphosphorylé. Le plasmide recombinant est appelé pUC8-A. Après digestion de pUC8-A par *Eco*RI, le fragment de 10,68 kb est inséré dans le site *Eco*RI du plasmide mobilisable pGR5, un dérivé du plasmide pSS1129 portant les régions flanquantes 5' et 3' du gène *fhaB* (Locht *et al.*, 1992). Le plasmide résultant (appelé pGR53) est transféré dans la souche mobilisante *E. coli* S17-1 pour la conjugaison avec *B. pertussis* (Simon, R., Priefer, U., et Puhler, A. (1983) *Bio/Technology* 1, 784-791).

Pour introduire la construction génétique de façon dirigée au locus chromosomique *fhaB*, la souche *E. coli* S17-1(pGR53) est croisée avec *B. pertussis* BPGR4. Cette souche étant dépourvue de la majorité du gène de structure *fhaB*, les événements de double recombinaison homologue sont forcés au niveau des régions flanquantes de ce gène. Après conjugaison, les deux événements de recombinaison sont sélectionnés successivement sur des milieux sélectifs comme décrit précédemment (Antoine, R., et Loch, C. (1990) *Infect. Immun.* 58, 1518-1526).

Brièvement, *E. coli* S17-1(pGR53) (Sm^S , Gen^R , Nal^S) est croisée sur un milieu solide de Bordet-Gengou (BG) avec *B. pertussis* BPGR4 (Sm^R , Gen^S , Nal^R). Après 6 heures de conjugaison, les transconjuguants sont sélectionnés sur un milieu sélectif (BG + Gentamycine + Acide Nalidixique). La résistance à la gentamycine est amenée par le plasmide pGR53 et celle à l'acide nalidixique est portée par le chromosome de la souche *B. pertussis* BPGR4. Environ 50 colonies isolées sont ensuite purifiées sur le milieu BG + Gentamycine + Acide Nalidixique. Afin de déterminer quel clone Gen^R a bien intégré le plasmide pGR53, les transconjuguants sont déposés en réplique sur le milieu sélectif BG + Streptomycine, puis BG + Gentamycine + Acide Nalidixique. Les colonies ayant intégré le plasmide pGR53 sont sensibles à la streptomycine (le caractère de sensibilité à la streptomycine étant dominant sur celui de la résistance). Les transconjuguants Gen^RSm^S sont alors étalés sur le milieu sélectif BG + Streptomycine pour sélectionner le second événement de recombinaison correspondant à l'excision du plasmide intégré. Si

ce "crossing-over" se réalise au même endroit que la première fois, on retrouve la construction initiale correspondant à la souche BPGR4. Si le second "crossing-over" a lieu dans l'autre région recombinogène, la construction est intégrée dans le génome de *B. pertussis*. L'excision du plasmide ayant apporté la construction est contrôlée par l'apparition du phénotype Sm^R Gen^S.

Les clones candidats résistants à la streptomycine et portant l'échange allélique voulu sont identifiés par hybridation sur colonies avec une sonde correspondant au fragment *Bgl*III de 0,68 kb décrit plus haut. L'intégrité chromosomique à la jonction des régions flanquantes est confirmée après analyse de l'ADN génomique par Southern blot.

L'antigénicité de la protéine de fusion hétérologue a été mise en évidence par l'analyse en Western blot après séparation par SDS-PAGE en utilisant un gel de 10%. La fraction protéique issue du surnageant de culture et celle associée aux cellules, après croissance des bactéries recombinantes en culture liquide dans du milieu Stainer-Scholtes ont été analysées. La protéine de fusion est identifiée dans les fractions protéiques avec des anticorps polyclonaux dirigés contre la FHA, des anticorps monoclonaux dirigés contre la FHA (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990), des anticorps polyclonaux de rat dirigés contre la FHA tronquée, des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la Sm28GST et des anticorps polyclonaux de rat dirigés contre le peptide 190-211 de la Sm28GST. Les anticorps anti-FHA ont été préalablement épuisés contre un lysat total de la souche de *B. pertussis* BPGR4 tandis que les anticorps anti-Sm28GST ont été épuisés contre un lysat total de la souche *B. pertussis* BPSM.

La protéine de fusion est mise en évidence dans la fraction protéique associée aux cellules de la souche BPGR5 où une bande protéique (doublet) d'une taille légèrement supérieure à la FHA réagit à la fois avec des anticorps anti-FHA (fig. 6) et des anticorps anti-Sm28GST (fig. 7). La fusion génétique est donc bien exprimée dans ce nouveau système d'expression hétérologue. Des produits de dégradation (caractéristiques de la FHA) sont également observés dans la fraction protéique associée aux cellules. Cependant, aucun polypeptide n'est immunodéecté dans le surnageant brut de culture,

indiquant que la protéine de fusion n'est pas produite efficacement sous une forme sécrétée.

Quand la souche *B. pertussis* BPGR5 est cultivée pendant plus de 48 heures et que le surnageant de cette culture en phase stationnaire est concentré sur une colonne d'héparine-sépharose, un produit de sécrétion est détectable (fig. 8). Il correspond à un produit clivé de la protéine de fusion puisqu'il ne réagit qu'avec les anticorps anti-FHA et pas avec les anticorps anti-Sm28GST. Il paraît donc vraisemblable que dans cette construction la portion de la molécule Sm28GST insérée à l'extrémité de la FHA mature incomplète reste accrochée du côté interne de la membrane externe de la bactérie puisqu'il n'est pas possible de relarguer la protéine de fusion complète dans le surnageant de culture.

VIII. Construction de la souche *B. pertussis* BPGR6, produisant une Sm28GST tronquée de *S. mansoni* en fusion avec la FHA.

Pour mieux exposer l'antigène hétérologue, il nous a semblé plus judicieux de conserver la région de la FHA en aval de l'insertion de la molécule Sm28GST pour ainsi exprimer l'entièreté du précurseur et favoriser l'exportation de la protéine de fusion à travers les deux membranes de *B. pertussis*. Pour cette raison, le cadre de lecture du gène *fhaB* est conservé après l'insertion de l'antigène ou du peptide hétérologue dans les constructions suivantes.

Pour la construction de la souche *B. pertussis* BPGR6, nous avons utilisé un fragment contenant les trois-quarts de l'ADNc de Sm28GST de telle sorte que le cadre de lecture de *fhaB* soit maintenu après l'insertion du gène codant pour une Sm28GST tronquée par délétion de l'extrémité C-terminale du gène. Le gène codant pour la Sm28GST tronquée correspond au fragment *Bgl*III-*Bcl*II de 0,5 kb. Ce fragment a été isolé à partir du fragment *Bgl*III de 0.68 kb et digestion par *Bgl*III et *Bcl*II. Le fragment de 0.5 kb a ensuite été inséré dans le plasmide pRIT13202 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990) digéré par *Bgl*III et *Bcl*II éliminant ainsi 0,1 kb du cadre de lecture de *fhaB*. Le plasmide ainsi obtenu est appelé pUC8-F. Le fragment *Eco*RI de 10,4 kb a ensuite été isolé de

pUC8-F, inséré dans pGR5 (Locht *et al.*, 1992) préalablement digéré par *EcoRI*. Le plasmide pGR54 résultant est ensuite introduit dans la souche *E. coli* S17-1.

La souche *E. coli* S17-1(pGR54) est alors croisée avec *B. pertussis* BPGR4 afin d'intégrer la construction dans le locus *fhaB* chromosomique comme décrit dans l'exemple VII. Après sélection des deux événements de recombinaison et analyse par Southern blot, la souche *B. pertussis* BPGR6 est retenue. Cette souche est donc un dérivé de *B. pertussis* BPSM avec une délétion de 0,1 kb dans le gène *fhaB* et l'insertion chromosomique à cet endroit du gène codant pour la Sm28GST tronquée.

La protéine de fusion est mise en évidence dans la fraction protéique associée aux cellules de la souche BPGR6 où une bande protéique d'une taille légèrement supérieure à la FHA réagit à la fois avec des anticorps anti-FHA (fig. 6) et des anticorps anti-Sm28GST (fig. 7) mais de façon moindre par rapport à la souche BPGR5. Par contre, quand le surnageant d'une culture en phase stationnaire de la souche BPGR6 est concentré sur héparine-sépharose, un produit de sécrétion réagit à la fois avec les anticorps anti-FHA et anti-Sm28GST (fig. 7 et 8), démontrant donc que la protéine de fusion est sécrétée de BPGR6 et/ou présentée à la surface de la bactérie, du côté extérieur. La sécrétion de la protéine de fusion complète reste peu efficace puisque le produit sécrété est majoritairement clivé, comme observé déjà pour la souche BPGR5.

IX. Construction de la souche *Bordetella pertussis* BPGR60, produisant une Sm28GST modifiée de *S. mansoni* en fusion avec la FHA.

La Sm28GST contient une cystéine éventuellement capable de former un pont disulfure. Or, la présence de ponts disulfure peut être un facteur limitant dans l'exportation efficace de protéines dans le surnageant de culture de bactéries gram négatives (Klauser, T., Pohlner, J., et Meyer, T. F. (1990) *EMBO J.* 9, 1991-1999; Klauser, T., Pohlner, J., et Meyer, T. F. (1992) *EMBO J.* 11, 2327-2335). Nous avons donc tenté de produire une protéine de fusion entre la FHA et une Sm28GST dont le codon TGC codant pour la cystéine (en position 140 dans la protéine) a été remplacé par le codon AGC codant pour une sérine et où le codon stop de traduction a été éliminé.

La construction résultante est donc telle que le cadre de lecture de *fhaB* est maintenu après l'insertion du gène *Sm28* modifié.

Le fragment *Bgl*III-*Sal*I du gène codant pour la *Sm28GST* modifiée au niveau du codon cystéine a été amplifié par PCR ("polymerase chain reaction"), à l'aide d'amorces spécifiques complémentaires de ces deux régions du gène. Les séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces d'amplification sont présentées ci-dessous : sont oligo 5' : 5' TAAGGATCCCCATGGCTGGCGAGCATATCAAG 3' et oligo 3' : 5' CCTGTCGACCCTTTCAGAGATTTCGCTGATCATATTGAG 3'. Le produit de 0,44 kb de la PCR a été digéré par *Pst*I et *Sal*I et le fragment de 0,28 kb a été cloné dans le plasmide pUC7-28 préalablement digéré par *Pst*I-*Sal*I, ce qui génère pUC7-28*. Le plasmide pUC7-28 est un dérivé de pUC7 digéré en *Bam*HI (élimination des sites *Pst*I et *Sal*I internes dans pUC7) et ligué avec le fragment *Bam*HI de 0,64 kb provenant de l'amplification par PCR de l'ADNc entier codant pour la *Sm28GST*. Cette amplification par PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants : oligo 5' : 5' TAAGGATCCCCATGGCTGGCGAGCATATCAAG 3'; oligo3' : 5' TAAGGATCCCGAAGGGAGTTGCAGGCCTGTT 3'. Les séquences des linkers *Bam*HI ont été choisies de telle manière que ces sites de restriction sont compatibles de chaque côté avec la phase de lecture commençant au site *Bgl*III du gène *fhaB*. Le fragment *Bam*HI du plasmide pUC7-28* est donc isolé et cloné au site *Bgl*III du plasmide pRIT13202, ce qui génère le plasmide pUC8-928*. Ce plasmide est ensuite digéré par *Eco*RI et le fragment *Eco*RI est introduit dans le plasmide pGR5 digéré auparavant par *Eco*RI. Le plasmide pGR540 résultant est ensuite introduit dans la souche d'*E. coli* S17-1.

La souche *E. coli* S17-1(pGR540) est alors croisée avec *B. pertussis* BPGR4 afin d'intégrer la construction dans le locus *fhaB* chromosomique comme décrit dans l'exemple VII. Après sélection des deux événements de recombinaison et analyse par Southern blot, la souche *B. pertussis* BPGR60 est retenue. Cette souche est donc un dérivé de *B. pertussis* BPSM contenant au niveau du site *Bgl*III du gène *fhaB* l'insertion chromosomique du gène codant pour la *Sm28GST* modifiée.

Dans la souche *B. pertussis* BPGR60, la protéine de fusion est bien visualisée dans la fraction protéique associée aux cellules, où une bande protéique réagit à la fois avec des anticorps anti-FHA (fig. 9) et des anticorps anti-Sm28GST (fig. 10). Dans le surnageant brut, des polypeptides réagissant seulement avec les anticorps anti-FHA sont observés (fig. 9). Quand le surnageant d'une culture en phase stationnaire de cette souche BPGR60 est concentré sur héparine-sépharose, un produit de sécrétion révélé à la fois avec les anticorps anti-FHA et anti-Sm28GST est mis en évidence. Cette reconnaissance est très semblable à celle de la souche BPGR6. La protéine de fusion est donc sécrétée et/ou présentée à la surface de la bactérie, du côté extérieur. Toutefois, la sécrétion de la protéine de fusion complète reste peu efficace et là encore, le produit sécrété est majoritairement clivé.

X. Etude de la colonisation de la souche recombinante *B. pertussis* BPGR60 chez la souris après administration par voie nasale.

Afin d'étudier la colonisation de la souche recombinante BPGR60 chez la souris OF1 (souche non pure, souris femelles âgées de 4 semaines), 5×10^6 bactéries en suspension dans du PBS (cellule grattées d'une culture sur milieu solide, Bordet Gengou avec du sang défibriné de mouton (BG); Bordet, J., et Gengou, O. (1906) *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 20, 731-741) étaient instillées nasalement à raison de 25 μ l par narine, sous anesthésie au pentobarbital. Les poumons de 4 à 7 souris étaient prélevés 3 heures après injection, puis à 7, 14, 21, et 28 jours après injection. Les poumons étaient alors homogénéisés dans 5 ml de PBS, puis les bactéries comptées après étalement des broyats sur milieu solide BG contenant 100 μ g/ml streptomycine et 25 μ g/ml acide nalidixique (BGS100N25).

Comme l'indique la figure 11A (ronds pleins), une colonisation au niveau des poumons est observée jusqu'au septième jour, puis est suivie par une chute jusqu'au 28 ième jour où la quasi totalité des bactéries a été éliminée. La cinétique de colonisation de BPGR60 est similaire à celle observée avec la souche sauvage BPSM (carrés vides) à cela

près que cette dernière dans cette expérience n'était pas totalement éliminée 28 jours après l'instillation.

Dans le cas où les souris ont reçu préalablement la souche BPGR60 et reçoivent ensuite la souche virulente BPSM, la souche sauvage ne présente plus de phase de croissance, et son élimination se trouve alors accélérée (triangles pleins).

La colonisation de la souche BPGR60 a également été étudiée chez la souris ayant été infectée auparavant par la souche sauvage Tohama I. Ainsi, 28 jours après l'instillation de Tohama I, les souris recevaient une dose de BPGR60, et le nombre des bactéries contenues dans leur poumons a été évalué. Dans ce cas, aucune phase de croissance de la souche BPGR60 n'est observée dans les 7 jours qui suivent l'administration (figure 11B, triangles pleins). Par contre, la chute du nombre de bactéries au cours du temps était plus rapide que celle observée 7 jours après l'administration de BPGR60 chez la souris naïve.

Ces résultats indiquent donc que la souche recombinante se comporte *in vivo* comme la souche sauvage et qu'une primo-infection par l'une des deux souches empêche la colonisation efficace des muqueuses respiratoires par l'autre souche.

XI. Etude de la production de cytokines inflammatoires consécutive à l'administration nasale de la souche recombinante *B. pertussis* BPGR60 chez la souris OF1.

La présence de certains micro-organismes ou même de micro-particules peuvent provoquer au niveau des muqueuses pulmonaires, des réactions inflammatoires liées à la présence de cellules capables de produire, après stimulation, des facteurs comme le "tumor necrosis factor" (TNF alpha) ou l'interleukine-6 (IL-6). Ces deux cytokines sont généralement produites localement et sont dosables dans les lavages broncho-alvéolaires. Dans certains cas graves, ces facteurs peuvent être décelés dans le sérum.

De la même façon que précédemment, 5×10^6 bactéries de la souche recombinante BPGR60 en suspension dans du PBS (cellule grattées d'une culture sur milieu solide BGS100N25) étaient instillées nasalement chez la souris OF1 à raison de 25 μ l par

narine, sous anesthésie au pentobarbital. Des souris recevant des particules de silice ou du PBS étaient utilisées comme témoins. Après 3, 6, 24 heures, puis 3 et 7 jours, la saignée et le lavage broncho-alvéolaire étaient procédés (5 souris par point).

Alors qu'aucune trace de TNF alpha et d'IL-6 n'étaient décelée dans le sang circulant même au delà de 7 jours, des quantités significatives des deux cytokines étaient trouvées dans les lavages broncho-alvéolaires (figure 12).

La production de TNF semblait être immédiate puisque, dès trois heures après injection, le taux maximal de sécrétion était atteint. Stable jusqu'à 6 heures au moins après injection, la quantité de TNF alpha était pratiquement nulle 24 heures après et restait négligeable jusqu'au 7ième jour.

La production d'IL-6, très faible les trois premiers jours, augmentait fortement le 3ième jour, puis revenait à un taux normal au septième jour.

Il semble donc que l'administration de BPGR60 induit une réaction inflammatoire localisée, qui est mise en évidence par l'augmentation de TNF et d'IL-6. Cette augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires était passagère puisque, 7 jours après instillation, les taux normaux de ces cytokines au niveau des poumons étaient retrouvés.

XII. Réponse immune après administration de la souche recombinante *B. pertussis* BPGR60 par voie nasale chez la souris OF1.

Les souris femelles OF1 de 4 semaines recevaient 5×10^6 bactéries en suspension dans du PBS (cellule grattées d'une culture sur milieu solide BGS100N25) à raison de 25 μ l par narine, sous anesthésie au pentobarbital. La réponse immune était évaluée dans le sang et les liquides broncho-alvéolaires 28, 35, 42, 49 et 56 jours après administration. Au 56 ème jour une partie de ces souris étaient alors restimulée par une nouvelle injection de la souche BPGR60 (mêmes conditions) ou soit par 20 μ g d'antigène recombinant purifié (Sm28GST produite chez *E. coli*), par voie nasale. La réponse immune était alors analysée aux jours 70, et 77. Cette réponse immune était comparée soit à celle de souris

saines élevées dans les mêmes conditions, soit à celle de souris n'ayant reçu que l'antigène recombinant seul.

Les résultats obtenus nous indiquent qu'aucune réponse sérique n'était obtenue contre l'antigène Sm28GST chez les souris ayant reçu une injection par voie nasale de BPGR60. Par contre, une forte réponse dans le sérum était observée contre la FHA. Cette réponse, observable dès 28 jours après l'administration, était maximale après 42 jours et présentait un plateau jusqu'au moment du rappel (Jour 63).

Par contre, lors de l'analyse de la réponse sécrétoire (IgA) dans les lavages broncho-alvéolaires, nous avons pu mettre en évidence une réponse anti-Sm28GST qui était maximale 42 jours après l'administration unique de la souche recombinante (Fig. 13). Cette réponse diminuait à partir du jour 49 et restait détectable au jour 56. En parallèle, une réponse anti-FHA était aussi trouvée indiquant une forte production d'IgA spécifique dès le 28 ième jour et maximale au 42 ième jour.

Le rappel avec la souche BPGR60 ou la protéine recombinante Sm28GST ne provoquait pas de changements significatifs de la quantité d'IgA sécrétoire anti FHA 7 jours après la seconde administration malgré une légère augmentation. Au jour 77 (14 jours après le rappel) le taux d'anti FHA diminuait dans les deux groupes.

Par contre le rappel par BPGR60 induisait, 7 jours après, une augmentation de la quantité d'anticorps sécrétoires spécifiques de la Sm28GST qui diminuait 14 jours après. Le rappel avec la protéine recombinante provoquait une forte augmentation du taux d'IgA sécrétoires spécifiques, plus importante que celle obtenue avec la souche BPGR60, mais assez hétérogène. Cette augmentation d'IgA anti Sm28GST n'était pas durable puisque dès 14 jours, ce taux chutait et retrouvait les valeurs obtenues juste avant le rappel. Aucune production d'anticorps IgA anti Sm28GST ou anti FHA n'était détectée dans les sécrétions broncho-alvéolaires de souris n'ayant reçu que la Sm28GST au moment du rappel.

L'administration par voie nasale de la souche BPGR60 exprimant la Sm28GST est donc capable d'induire une réponse immune sécrétoire vis-à-vis de cet antigène. Cette réponse anticorps peut être amplifiée par le rappel soit avec la souche recombinante, soit

avec la Sm28GST seule. Ce mode de vaccination pourrait être sans doute amélioré en différant le temps écoulé entre l'immunisation et le rappel (exemple : 90 jours au lieu de 56). Les quantités de bactéries et la dose de protéines peuvent être considérées comme optimales.

FIGURES

Figure 1. Analyse par SDS-PAGE et coloration au Bleu de Coomassie des surnageants de culture des souches *B. pertussis* BPSM, BPGR4 et BPGR41. Les marqueurs de taille et les surnageants de culture non concentrés des trois souches de *B. pertussis* ont été déposés sur gel de SDS-polyacrylamide. Après électrophorèse, le gel a été coloré au Bleu de Coomassie comme décrit par Sambrook *et al.* (1989). Les poids moléculaires des marqueurs de taille sont montrés dans la marge.

Figure 2. Analyse par électrophorèse (A) et Western blot (B) des surnageants de culture des souches *B. pertussis* BPGR41, BPGR413, BPGR48, BPGR44, BPGR412, BPGR415, BPGR4 et BPSM. Après électrophorèse, le gel a été coloré au Bleu de Coomassie comme décrit pour la figure 1 (A) ou transféré sur membrane de nitrocellulose et analysé par Western blot comme décrit par Delisse-Gathoye *et al.* (1990) à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-FHA de rat à une dilution de 1/1000. La carte des constructions qui sont à la base des différentes souches est montrée en C. E^a et E^b représentent respectivement le premier et deuxième site *EcoRI* du gène *fhaB* (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990).

Figure 3. Analyse par électrophorèse (A) et Western blot (B) des surnageants de culture des souches *B. pertussis* BPSM, BPGR4, BPMC, BPGR44, BPGM47, BPMC4, BPTO4 et *B. parapertussis* PEP4. Après électrophorèse, le gel a été coloré au Bleu de Coomassie comme décrit pour la figure 1 (A) ou analysé par Western blot en

utilisant l'antisérum anti-FHA de rat à une dilution de 1/500 (B) comme décrit pour la figure 2.

Figure 4. Carte de restriction des différents fragments d'ADN exprimé en fusion avec le gène codant pour MalE. La ligne noire en haut montre la longueur de la portion de *fhaB* qui code pour la FHA mature. N et C désignent respectivement les régions amino- et carboxy-terminales. La ligne noire au milieu montre la longueur de la phase ouverte de lecture de *fhaB*. E, *EcoRI*; Sp, *SphI*; S, *Sall*; B, *BamHI*. Les flèches montrent la longueur des fragments exprimés et leur direction d'expression.

Figure 5. Analyse par Western blot des surnageants de culture des souches *B. pertussis* BPSM, BPGR44, BPGR4 et BPJN1. Après électrophorèse, les gels ont été analysés par Western blot comme décrit pour la figure 2 en utilisant l'antisérum anti-FHA de rat à une dilution de 1/500 (A) ou un anticorps anti-peptide 190-211 de Sm28GST de rat à une dilution de 1/250 (B). La piste de gauche du gel (B) contient la Sm28GST recombinante purifiée.

Figure 6. Analyse par Western blot des surnageants de culture et des protéines associées aux cellules des souches *B. pertussis* BPSM, BPGR4, BPGR5 et BPGR6. L'analyse par Western blot des protéines issues des surnageants de culture (pistes 5 à 8) ou de fractions protéiques associées aux cellules (pistes 1 à 4) des différentes souches de *B. pertussis* BPSM (pistes 1 et 5), BPGR4 (pistes 2 et 6), BPGR5 (pistes 3 et 7) et BPGR6 (pistes 4 et 8) a été réalisée comme décrit pour la figure 2 en utilisant l'anticorps monoclonal anti-FHA 12.1.9 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990).

Figure 7. Analyse par Western blot des surnageants de culture et des protéines associées aux cellules des souches *B. pertussis* BPSM, BPGR5 et BPGR6. L'analyse par Western blot des protéines issues des surnageants de culture et purifiées sur matrice d'héparine-sépharose (pistes 4 à 6) ou de fractions protéiques associées aux cellules

(pistes 1 à 3) des différentes souches de *B. pertussis* BPSM (pistes 1 et 4), BPGR5 (pistes 2 et 5) et BPGR6 (pistes 3 et 6) a été réalisée comme décrit pour la figure 2 en utilisant un antisérum anti-Sm28GST de lapin dilué 200 fois.

Figure 8. Analyse par Western blot des surnageants de culture purifiés sur colonne de héparine-sépharose des souches *B. pertussis* BPSM, BPGR5 et BPGR6. L'analyse par Western blot des protéines issues des surnageants de culture et purifiées sur matrice d'héparine-sépharose des souches de *B. pertussis* BPSM (piste 1), BPGR5 (piste 2) et BPGR6 (piste 3) a été réalisée comme décrit pour la figure 2 en utilisant l'anticorps monoclonal anti-FHA 12.1.9 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990).

Figure 9. Analyse par Western blot des surnageants de culture et des protéines associées aux cellules des souches *B. pertussis* BPSM et BPGR60. L'analyse par Western blot des protéines issues des surnageants de culture (pistes 1 et 3) ou de fractions protéiques associées aux cellules (pistes 2 et 4) des souches *B. pertussis* BPSM (pistes 3 et 4), BPGR60 (pistes 1 et 2) a été réalisée comme décrit pour la figure 2 en utilisant l'anticorps monoclonal anti-FHA 12.1.9 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990).

Figure 10. Analyse par Western blot des surnageants de culture et des protéines associées aux cellules des souches *B. pertussis* BPSM et BPGR60. L'analyse par Western blot des protéines issues des surnageants de culture (pistes 1 et 3) ou de fractions protéiques associées aux cellules (pistes 2 et 4) des souches *B. pertussis* BPSM (pistes 1 et 2), BPGR60 (pistes 3 et 4) a été réalisée comme décrit pour la figure 2 en utilisant un antisérum anti-Sm28GST de lapin. La piste 5 contient la Sm28GST recombinante purifiée.

Figure 11. Colonisation de souris OF1 par *B. pertussis* BPGR60 et Tohama I. Les souris OF1 ont été infectées par voie nasale avec les souches *B. pertussis* Tohama I (carrés blancs), BPGR60 (ronds noirs), BPGR60 et puis Tohama I (triangles noirs en A)

ou Tohama I et puis BPGR60 (triangles noirs en B). Trois heures après l'infection, une série de souris a été sacrifiée et le nombre de *B. pertussis* viables estimé par poumon. Les autres groupes de souris ont été analysés une ou plusieurs semaines après infection comme montré sur la figure.

Figure 12. Dosage de TNF et Il-6 des souris infectées par *B. pertussis* BPGR60. TNF (A) et Il-6 (B) ont été dosées chez les souris non-infectées (saines) ou infectées par *B. pertussis* BPGG-60 3 hrs, 6 hrs, 1 jour, 3 jours ou 7 jours après infection.

Figure 13. Dosage d'IgA anti-Sm28GST et anti-FHA dans les lavages bronchoalvéolaires des souris OF1 infectées par *B. pertussis* BPGR60. Les souris OF1 ont été infectées avec *B. pertussis* BPGR60 par voie nasale. Après infection, aux jours indiqués sur la figure, des groupes de souris ont été sacrifiés et les IgA anti-Sm28GST (A) et anti-FHA (B) de leur liquide bronchoalvéolaires ont été dosés. Au jour 56 (en A) ou 63 (en B), 20 µg de Sm28GST (triangles noirs) ou une nouvelle dose de *B. pertussis* BPGR60 (carrés noirs) ont été administrés par voie nasale.

R E V E N D I C A T I O N S

1. ADN recombinant contenant une séquence (1) codant pour un polypeptide hétérologue vis-à-vis d'une hémagglutine filamenteuse de Bordetella (FHA) fusionnée dans le même cadre de lecture à une séquence (2) placée en amont de la première, cette séquence (2) codant pour une partie au moins du précurseur de la FHA, cette partie comportant au moins la région N-terminale d'une protéine mature tronquée de FHA qui contient le site d'interaction de la FHA avec l'héparine, d'une part, et qui, lorsque celle-ci est elle-même placée, seule, sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases cellulaires de B.pertussis et introduite dans une culture de cellules de B.pertussis, est exprimée dans cette culture sous le contrôle de ce promoteur et excrétée dans le milieu de culture de ces cellules, d'autre part.

2. ADN recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la FHA est une FHA de B.pertussis.

3. ADN recombinant selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la séquence (2) code pour la protéine mature de FHA.

4. ADN recombinant selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la séquence (2) résulte d'une troncature de la séquence codant pour la protéine mature FHA du côté de son extrémité C-terminale.

5. ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une séquence (3) en aval de la séquence (1), cette séquence (3) correspondant pour l'essentiel à la partie tronquée de la protéine mature, de préférence complétée par la séquence signal du précurseur.

6. ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence (2) comporte les signaux d'excrétion de la séquence codant pour la FHA et la région N-terminale homologue aux régions N-terminales des hémolysines Sh1A et HpNA de Serratia marcescens et Proteus mirabilis.

7. ADN recombinant selon la revendication 4 ou 6, caractérisé en ce que l'extension de la séquence (2) du côté de son extrémité C-terminale ne va pas au-delà de la longueur qui ferait que la transformation de B.pertussis avec cet ADN recombinant alors placé sous le contrôle d'un promoteur susceptible d'être reconnu par B.pertussis ne permette plus l'excrétion directe de la protéine recombinante alors formée dans le milieu de culture de ce B.pertussis.

8. ADN recombinant selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que la séquence (2) s'étend entre l'ATG correspondant au codon d'initiation de la traduction de la FHA à un nucléotide C-terminal au delà du nucléotide 907 dans la direction de la traduction et de préférence non au delà de la position 6922.

9. ADN recombinant selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il ne réagit plus avec des anticorps anti-FHA plus particulièrement dirigés contre les épitopes de la partie C-terminale de la FHA mature, situés au delà du site nucléotidique 2841 dans le sens de la traduction.

10. ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le polypeptide codé par la séquence (2) contient au moins un site spécifique d'attachement de la FHA aux muqueuses.

11. ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la séquence (1) code pour un polypeptide ayant des propriétés vaccinales vis-à-vis d'un agent pathogène donné.

12. ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il contient également un promoteur reconnu par les polymérases d'une cellule transformable avec un vecteur contenant l'ADN recombinant en question et autorisant l'expression des séquences (1) et (2), dès lors que se trouve également exprimé dans cette cellule un gène auxiliaire du type FHAc.

13. ADN recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur reconnu par les polymérases d'une bactérie de l'espèce Bordetella, notamment de B.pertussis qui dans le produit naturel régule l'expression de la protéine FHA.

14. Culture de cellules procaryotes, notamment bactéries, transformées avec un ADN recombinant selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce que le promoteur de l'ADN recombinant est reconnu par les polymérases de ladite cellule procaryote.

15. Culture selon la revendication 14, caractérisée en ce que les cellules appartiennent à une espèce Bordetella, notamment B.pertussis, et qu'elles sont également porteuses d'un gène FHAc exprimable dans ces cellules.

16. Culture selon la revendication 14, caractérisée en ce que les cellules appartiennent à une espèce bactérienne autre que Bordetella et qu'elles contiennent également une séquence codant pour au moins la partie de FHAc nécessaire à l'expression de la séquence (2), sous une forme

également exprimable au sein des cellules de cette culture.

17. Culture cellulaire selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisée en ce que l'ADN recombinant est incorporé à l'ADN chromosomique desdites cellules.

18. Culture de cellules selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisée par l'exposition du produit d'expression de la séquence (1) à leur surface.

19. Culture selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisée en ce que la séquence (2) contient au moins un site d'adhésion de la FHA aux muqueuses ou à des cellules eucaryotes, notamment macrophages ou cellules épithéliales.

20. Culture cellulaire selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est détournée ou atténuée.

21. Composition immunogène orientée contre un agent pathogène déterminé et caractérisée en ce qu'il contient à titre de principe actif, des cellules de la culture selon l'une quelconque des revendications 18 à 20 dans lesquelles la séquence (1) code pour un antigène caractéristique de cet agent pathogène.

22. Protéine recombinante constituée par le produit d'expression de l'ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

23. Protéine recombinante selon la revendication 22, caractérisée par le fait qu'elle comporte l'un au moins des sites d'adhésion de la protéine FHA aux muqueuses.

24. Protéine recombinante selon la revendication 23, caractérisée en ce que le produit d'expression de la séquence (1) code pour un polypeptide ayant des propriétés vaccinales vis-à-vis d'un agent pathogène donné et en ce que le produit d'expression de la

séquence (2) contient un site d'adhésion de la FHA aux muqueuses ou à des cellules eucaryotes, notamment macrophages ou cellules épithéliales.

25. Composition vaccinnante contenant la culture cellulaire de la revendication 21 ou la protéine recombinante de la revendication 24, caractérisée en ce qu'elle présente l'immunogénicité mucoale de la FHA, notamment pour l'administration par voie nasale.

26. Procédé pour la production d'une protéine hétérologue recombinante contenant une séquence polypeptidique déterminée caractérisée par la transformation d'une culture de cellules procaryotes avec un vecteur contenant un ADN recombinant conforme à l'une quelconque des revendications 1 et 6 à 13, lesdites cellules procaryotes contenant également une séquence nucléotidique codant pour FHAc sous une forme susceptible d'y être exprimée ou ayant également été transformées à cette fin, puis la culture de ces cellules et la récupération du produit excrété par les cellules de cette culture dans leur milieu.

27. Procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce que lesdites cellules procaryotes sont des Bordetella, notamment du type B.pertussis.

28. Procédé selon la revendication 26 ou 27, caractérisé par la purification supplémentaire du produit d'excrétion par mise en contact du milieu de culture avec de l'héparine immobilisée sur un support insoluble et par récupération de la protéine recombinante purifiée par dissociation du complexe qu'il formait avec l'héparine.

(pour revue voir Locht, C. Bertin, P., Menozzi, F.D., et Renauld, G. (1993) Mol. Microbiol. 9, 653-660). Le gène de structure de la FHA, appelé fhaB, a été cloné dans plusieurs laboratoires (Brown, D.R., et Parker, C.D. (1987) Infect. Immun., 55, 154-161 ; Relman, D.A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R., et Falkowo, S. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 86, 2637-2641 ; Delisse-Gathoye, A.-M., Locht, C., Jacob, F., Raaschou-Nielsen, M., Heron, I., Ruelle, J.-L., DeWilde, M., et Cabezon, T. (1990) Infect. Immun. 58, 2895-2905) et code pour un précurseur d'environ 367 kDa (Delisse-Gathoye et al., 1990 ; Domenighini, M., Relman, D., Capiou, C. Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V., et Rappuoli, R. (1990) Mol. Microbiol. 4, 787-800). La partie N-terminale de ce précurseur correspond à la partie mature de la FHA et la partie C-terminale est perdue lors de la maturation et/ou sécrétion de la protéine.

En aval du gène fhaB se trouve un opéron polycistronique responsable à la fois de la biogenèse de la FHA et des fimbriae, aussi appelées agglutinogènes (Locht, C. Geoffroy, M.C., et Renauld, G. (1992) EMBO J. 11, 3175-3183). Cet opéron contient quatre cistrons dont les produits des trois premiers sont homologues aux protéines accessoires et à l'adhésine de pili de plusieurs bactéries gram négatives (Locht et al., 1992) et impliqués dans la biogenèse des fimbriae de B.pertussis, et dont le produit du dernier est homologue à ShlB et Hpmb et est impliqué dans la biogenèse de la FHA (Willems, R.J.L., Geuijen, C., van der Heide, H.G.J., Renauld, G., Bertin, P. van den Akker, W.M.R., Locht, C., et Mooi, F.R. (1994) Mol. Microbiol. 11, 337-347).

Par ailleurs, la région N-terminale de la FHA est homologue aux régions N-terminales des hémolysines ShlA et Hpmb de Serratia marcescens et Proteus

dans ce qui suit, que la protéine recombinante, y incluse la séquence en acides aminés correspondantes aux polypeptides hétérologues se trouve exposée à la surface de ces cellules.

La protéine excrétée dans le milieu de culture peut être davantage purifiée, notamment par un procédé consistant à mettre en contact le milieu de culture avec l'héparine immobilisée sur un support insoluble pour former un complexe héparine-FHA, la protéine recombinante pouvant alors être récupérée par dissociation du complexe.

Dans la suite de cet exposé, il sera vu que les premiers essais ont été effectués dans une souche B.pertussis BGR4 dont la partie la plus importante de la phase de lecture du gène fhaB et son promoteur avaient été délétés du chromosome par deux éléments successifs de recombinaison homologues. L'ADN recombinant contenait un fragment EcoRI d'environ 10 kb isolé à partir d'un clone qui avait été entièrement séquencé, notamment par Delisse-Gathoye et al., 1990. C'est par rapport à la séquence décrite par ces auteurs que sont précisées dans le corps du présente texte, les positions relatives de certains des nucléotides dans le chromosome B.pertussis correspondant, le premier site d'EcoRI E^a correspondant à la position 1, et le second site E^b occupant alors la position 10035.

L'ATG d'initiation de la traduction se trouve en aval du site E^a (l'un des trois ATG aux positions respectivement 253, 298, 427) le promoteur correspondant étant intercalé entre le site E^a et l'ATG d'initiation pertinent. Le précurseur s'étend jusqu'au delà de la position du site E^b (position 11025).

Comme cela sera décrit de façon plus détaillée dans les exemples, plusieurs ADNs recombinants ont été

l'excrétion. Ainsi, le fragment contenu dans le plasmide BPGR412 est-il encore exprimé à un moindre degré, même si aucune bande n'est observée sur la figure 2 pour la piste d'électrophorèse sur gel correspondante au plasmide BPGR412. Mais, la mise en contact d'une culture correspondante avec l'héparine immobilisée a permis d'isoler une fraction excrétée reconnue par des anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement la région N-terminale de la FHA.

Il apparaît que des séquences (2) entrant dans les ADNs recombinants selon l'invention doivent, en tout état de cause, comporter des signaux d'excrétion de la séquence codant pour la FHA et la région N-terminale homologue aux régions N-terminales des hémolysines Sh1A et HpMA de Serratia marcescens et Proteus mirabilis.

Pour la mise en oeuvre de l'une des applications préférées de l'invention, à savoir la production d'un peptide hétérologue et sa récupération à partir du milieu de culture, il apparaît par conséquent que l'extension de la séquence (2) à partir de l'extrémité N-terminale de la FHA vers son extrémité C-terminale sera choisie de façon à ne pas aller au delà de la longueur qui ferait que la transformation de B.pertussis avec cet ADN recombinant alors placé sous le contrôle d'un promoteur susceptible d'être reconnu par B.pertussis ne permettrait plus l'excrétion directe de la protéine recombinante alors formée dans le milieu de culture de ce B.pertussis.

Dans le cadre de cette application, un ADN recombinant préféré est caractérisé en ce que la séquence (2) s'étend entre l' TG correspondant au codon d'initiation de la traduction de la FHA à un nucléotide C-terminal au delà du nucléotide 907 dans la direction de la traduction et de préférence non au delà de la position 6292.

des séquences tronquées de l'ADN codant pour une FHA de Bordetella. Comme cela a été vu plus haut, l'invention concerne également les ADN recombinants contenant des séquences (2) plus longues, chaque fois que sera au contraire recherchée la production de cellules procaryotes, notamment de bactéries portant, exposé à leur surface, le produit d'expression de l'ADN recombinant susdéfini. La séquence hétérologue (1) peut soit être incorporée à l'intérieur même de la séquence codant pour FHA, voire même FHAb, soit être fusionnée à la FHA mature ou le précurseur avec conservation du code de lecture correspondant.

Dans le cas où la cellule hôte, le cas échéant, après atténuation ou inactivation, peut être utilisée comme support de vaccin, on apprécie que l'invention fournit de nouvelles variétés vaccinales comportant des cellules procaryotes de ce type portant exposées à leur surface le produit d'expression de l'ADN recombinant. Avantagusement, seront exposés à la surface des bactéries en cause, à la fois la séquence en acides aminés correspondante aux sites antigéniques du peptide hétérologue, d'une part, et l'un des sites d'adhésion de la protéine FHA aux muqueuses ou encore à d'autres cellules eucaryotes, telles que des cellules épithéliales ou des macrophages.

A titre d'exemples de technique pouvant être utilisés pour obtenir cette orientation convenable, on fera référence au brevet européen n°0242243 déposé le 06/03/87.

Alors que dans le cas de la production in vitro d'une protéine ou d'une polypeptide recombinant, l'on pouvait avoir des cellules procaryotes transformées par un plasmide, il apparaît que pour la réalisation de bactéries porteuses du produit d'expression de l'ADN recombinant à leur surface, il est préférable que celui-ci ait été incorporé sous le contrôle du

II. Délétions progressives de la région C-terminale de FhaB.

Le produit primaire du gène *fhaB*, i. e. le précurseur de la FHA, est appelé FhaB. Puisque la région N-terminale homologue aux hémolysines ShlA et HpmA est importante pour la biogenèse de la FHA (Willems *et al.*, 1994), il était important d'investiguer le rôle de la région C-terminale de FhaB dans la biogenèse de la FHA. Plusieurs délétions de la région C-terminale ont été obtenues : pBG13 est le résultat de l'échange du fragment *SphI/BamHI* de 2.5 kb de pBG4 par le fragment *SphI/BglII* de 6 kb de pRIT13202 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990); pBG8 est le résultat de l'insertion du fragment *BamHI* de 4.7 kb dans pBG4 digéré par *BamHI*; pBG4 est le résultat de la digestion de pBG1 par *BamHI* et de sa religation, ce plasmide a donc perdu les deux fragments *BamHI* de 4.7 kb et de 2.37 kb; pBG12 est le résultat de l'échange du fragment *SphI/BamHI* de 2.5 kb de pBG4 par le fragment *SphI/BamHI* de 1.27 kb de pUC18-3, pUC18-3 a été généré en échangeant le fragment *SphI/SalI* de 15 pb de pUC18 par le fragment *SphI/SalI* de 1.27 kb de pRIT13197 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990); pBG15 est le résultat de la religation des deux fragments *PvuI* de 3.65 kb et 2.76 kb après digestion de pBG4 par *PvuI*, générant ainsi la délétion du fragment *PvuI* de 1.9 kb. Les plasmides pBG13, pBG8, pBG4, pBG12 et pBG15 ont été introduits dans *B. pertussis* BPGR4 par électroporation ce qui a généré les souches *B. pertussis* BPGR413, BPGR48, BPGR44, BPGR412 et BPGR415, respectivement.

Les surnageants de culture de ces différentes souches ont été analysés par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie ainsi que par Western blot en utilisant des anticorps polyclonaux de rat anti-FHA. Les résultats sont montrés dans la figure 2 et indiquent que par rapport à la souche *B. pertussis* BPSM et la souche *B. pertussis* BPGR41, les souches BPGR413 et BPGR48 produisent beaucoup moins de FHA dans le surnageant de culture. Par contre, la souche BPGR44 produit plus de FHA tronquée et sécrétée que la souche BPSM ou la souche BPGR41. Les souches BPGR412 et BPGR415 produisent à nouveau moins de FHA tronquée que la souche BPGR44, bien que la FHA tronquée produite par BPGR412 est clairement visible dans le surnageant de culture. Ces expériences montrent l'importance de la région C-terminale de FhaB dans la

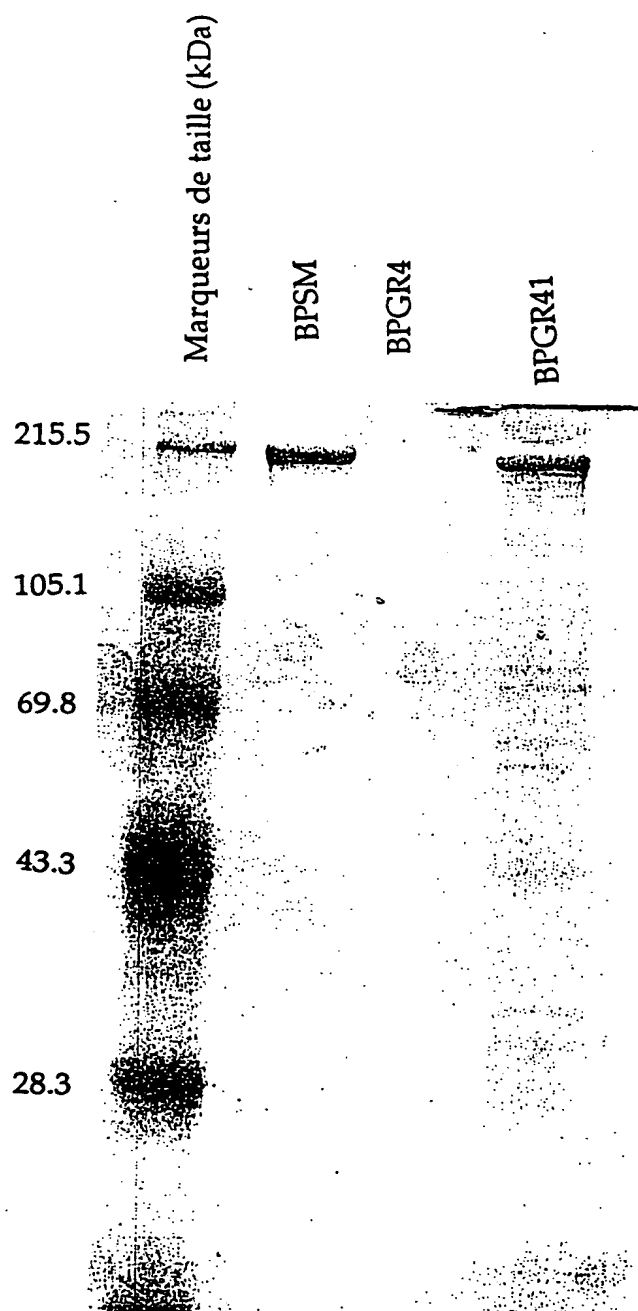


FIGURE 1

2 / 14

Fig 2A

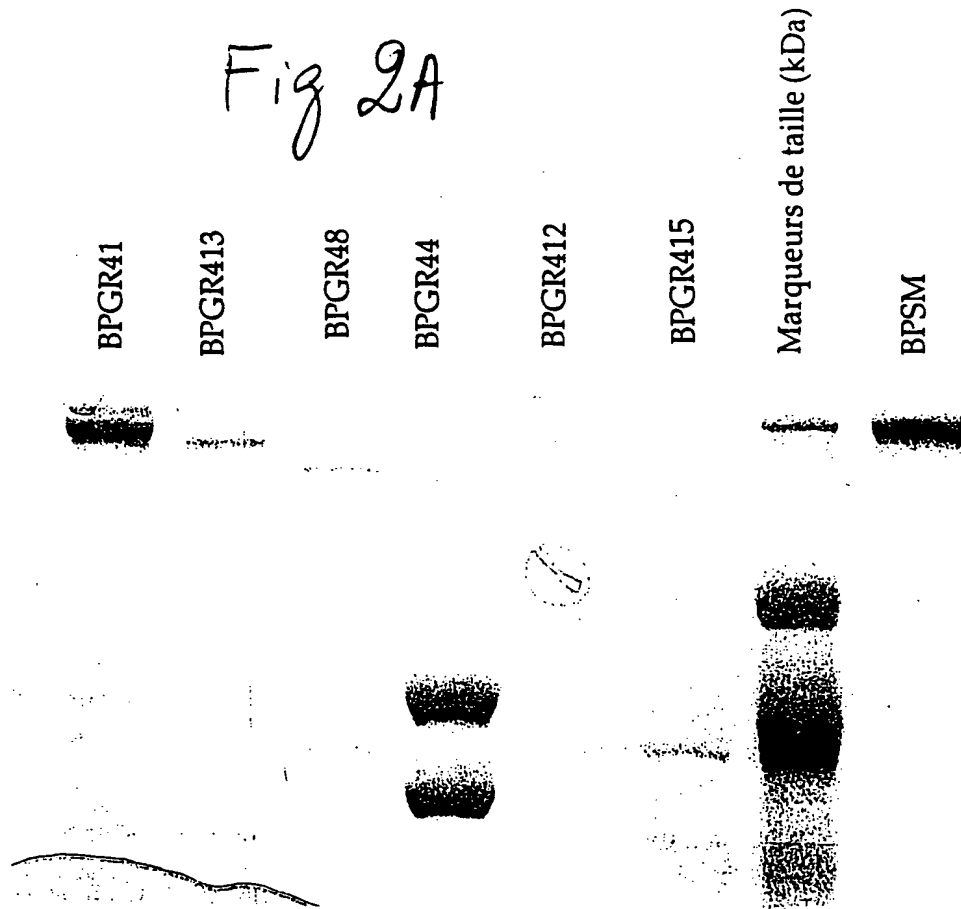
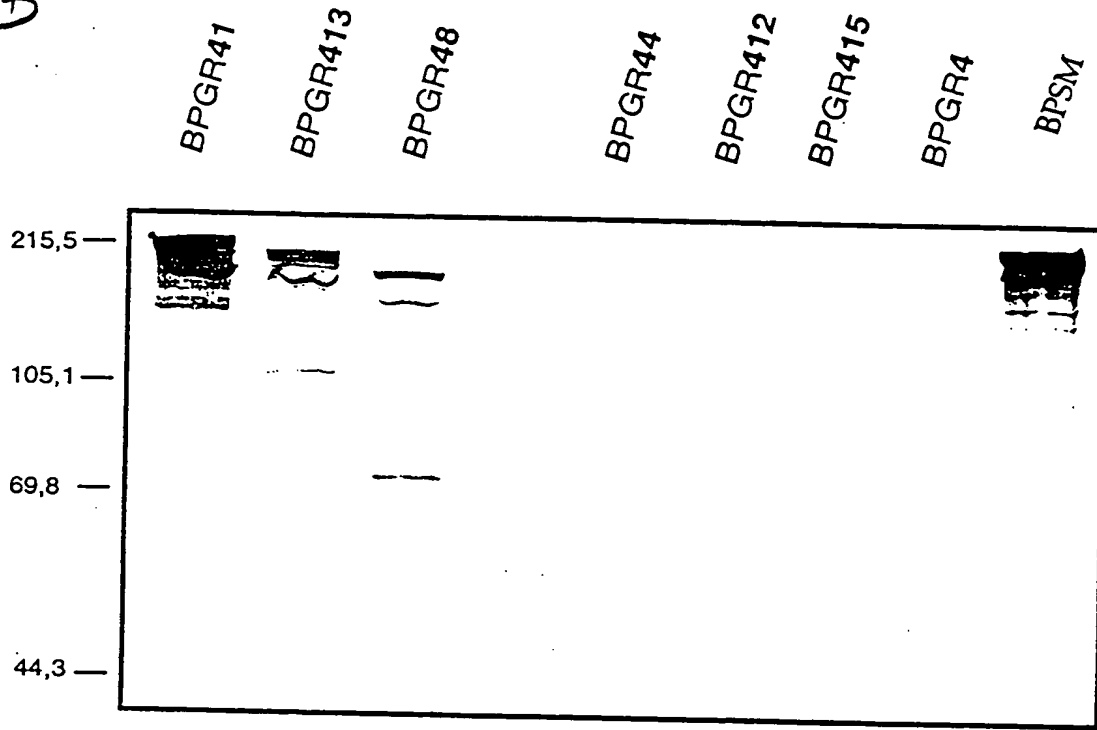


Fig 2B



Ac P rat anti-FHA 1/1000

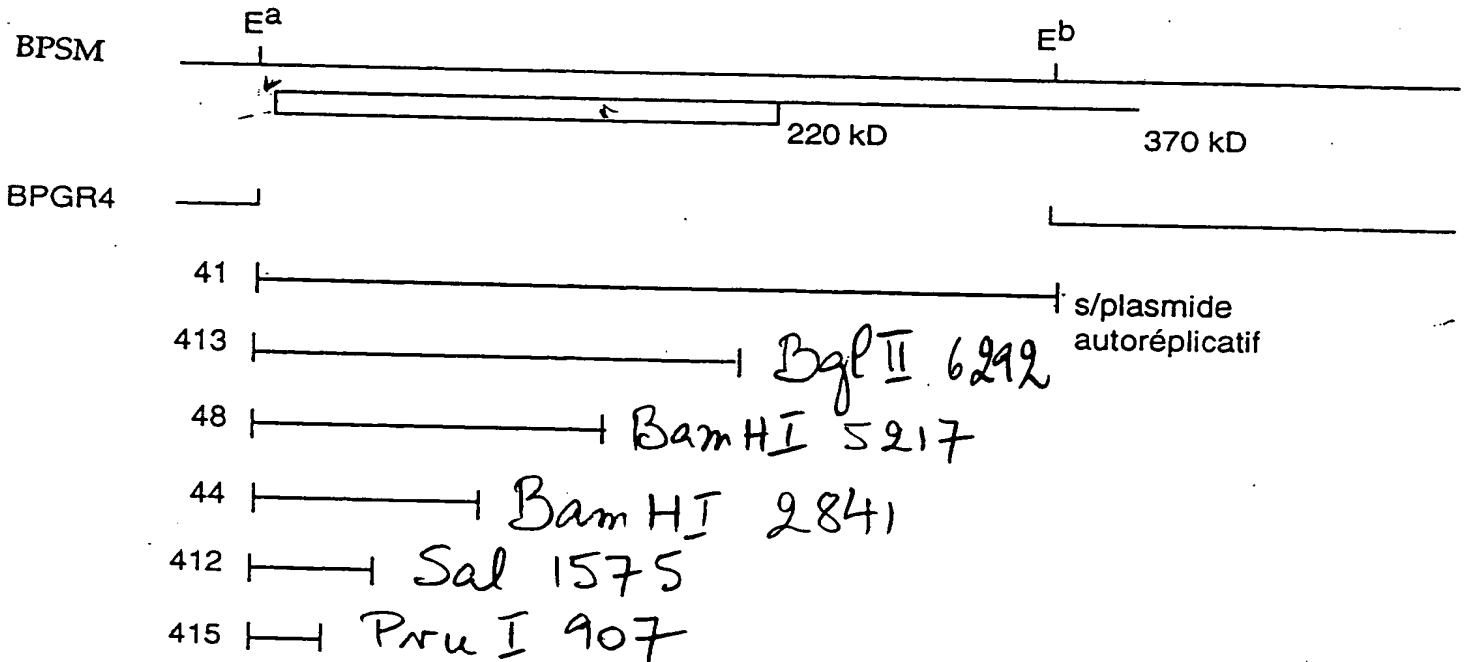
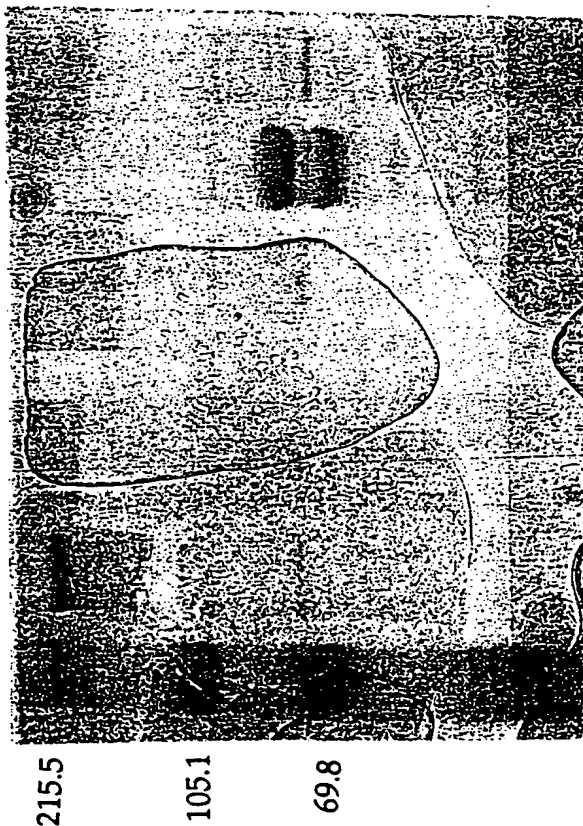


Fig 2C

Fig. 3 A

Marqueurs de taille (kDa)

BPSM
BPCR4
BPCR47
BPMC
BPCR44
BPMC4



A

Marqueurs de taille (kDa)

BPSM
BPCR4
PEP4
BPSM4
BPCR44

215.5
105.1
69.8
43.3
28.3



Fig 3 B

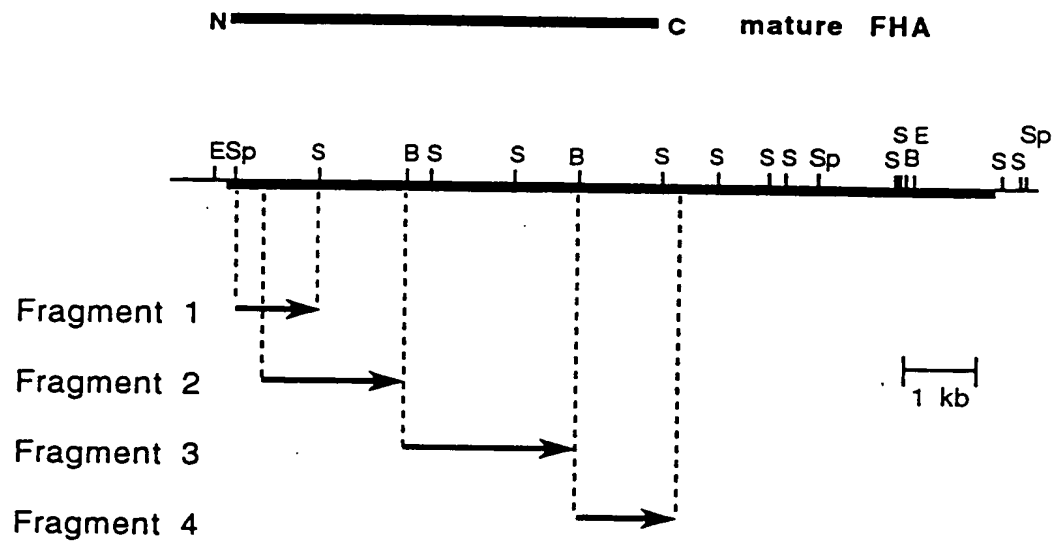


FIGURE 4

Fig 5B

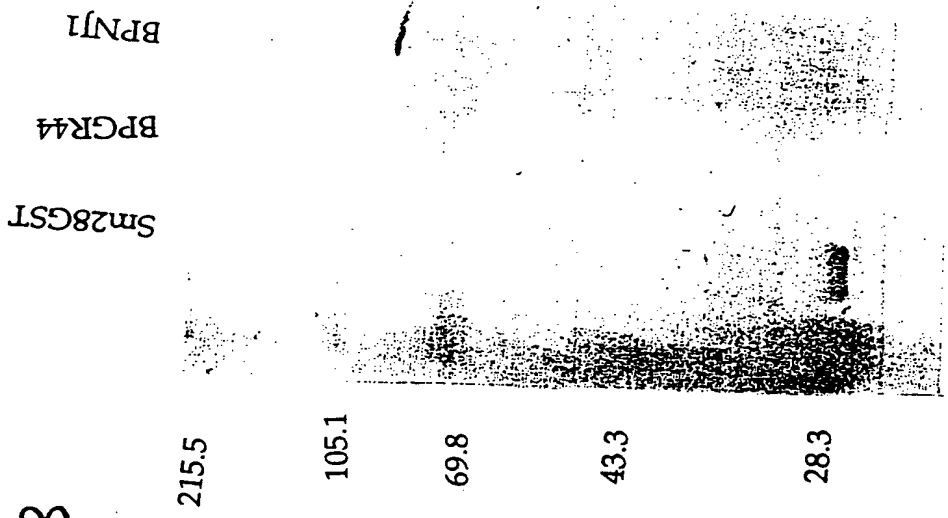
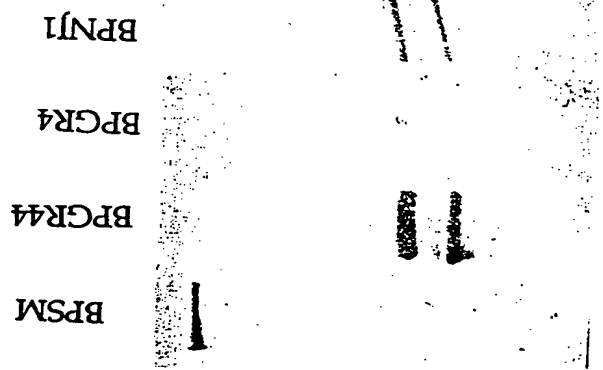


Fig 5A



7 / 14

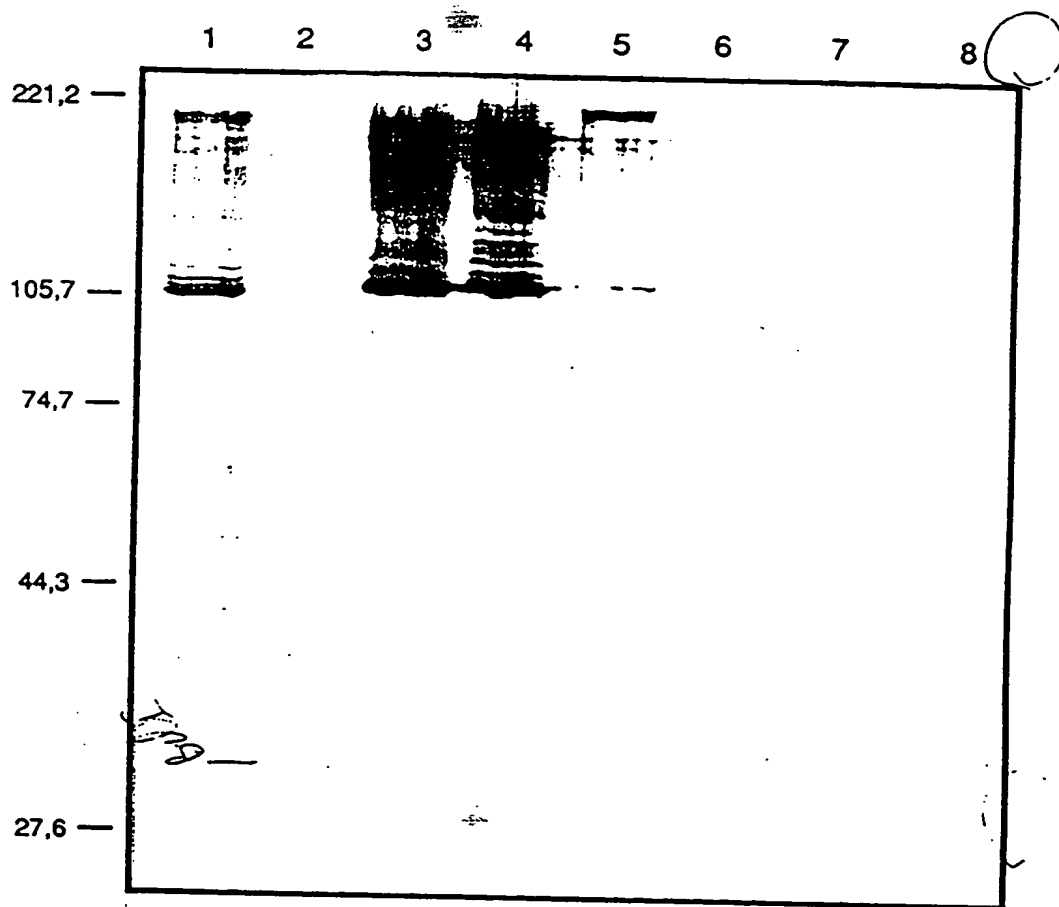


FIGURE 6

8 / 14

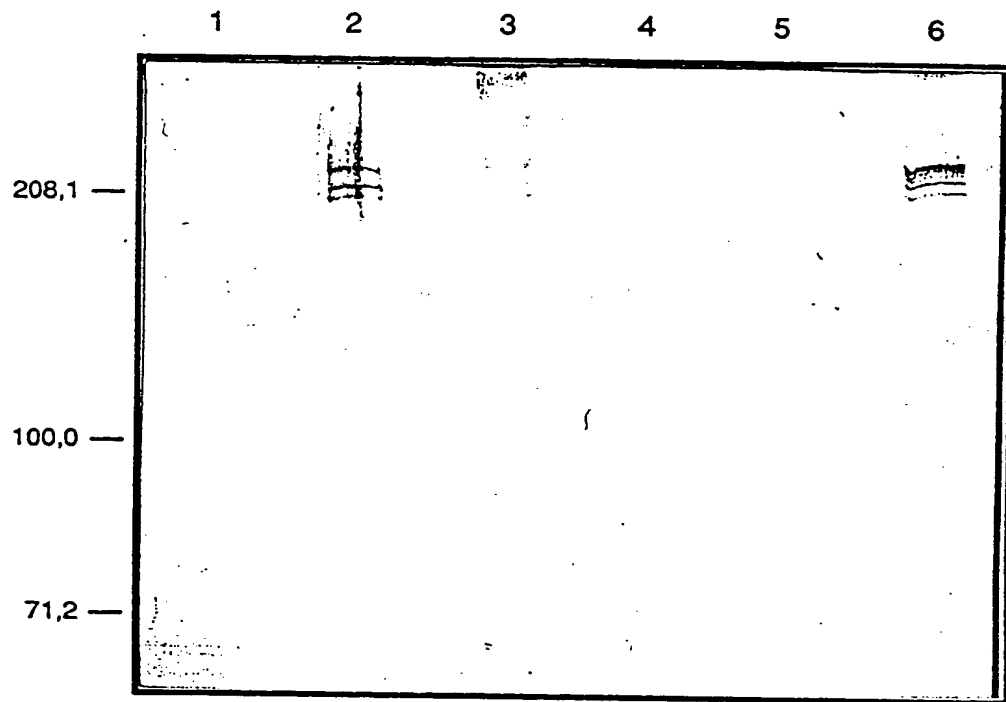


FIGURE 7

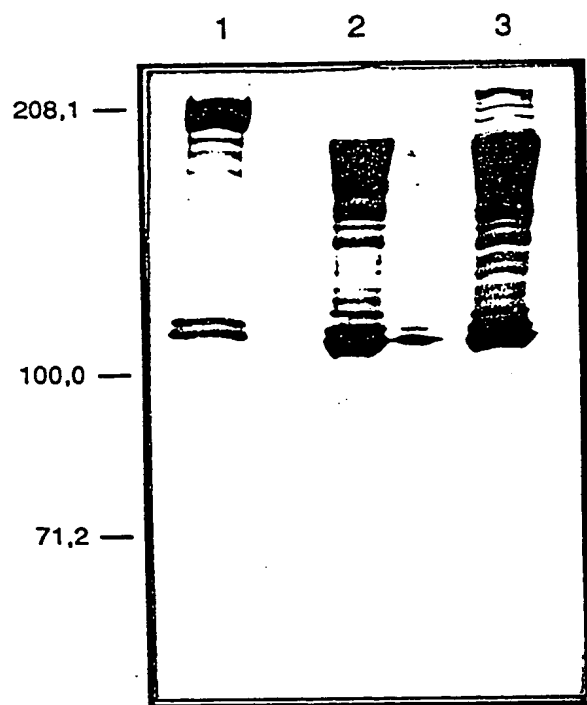


FIGURE 8

10 / 14

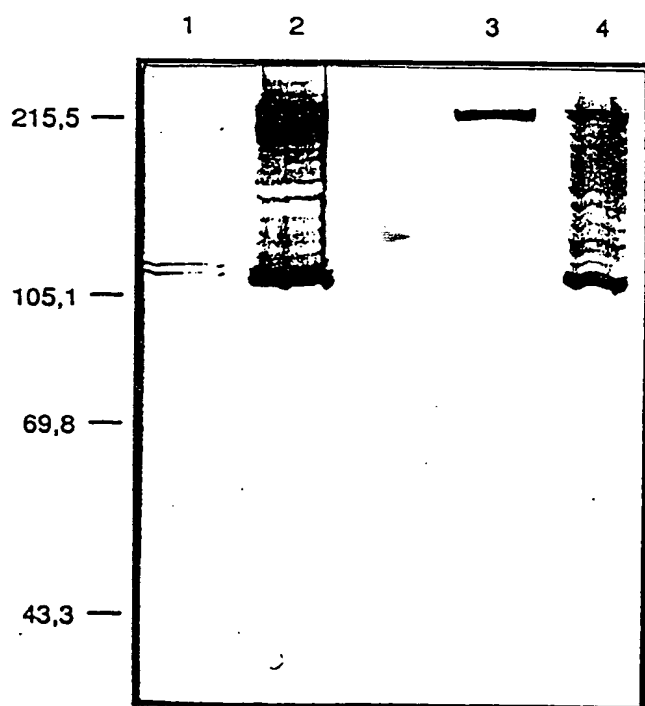


FIGURE 9

11 / 14

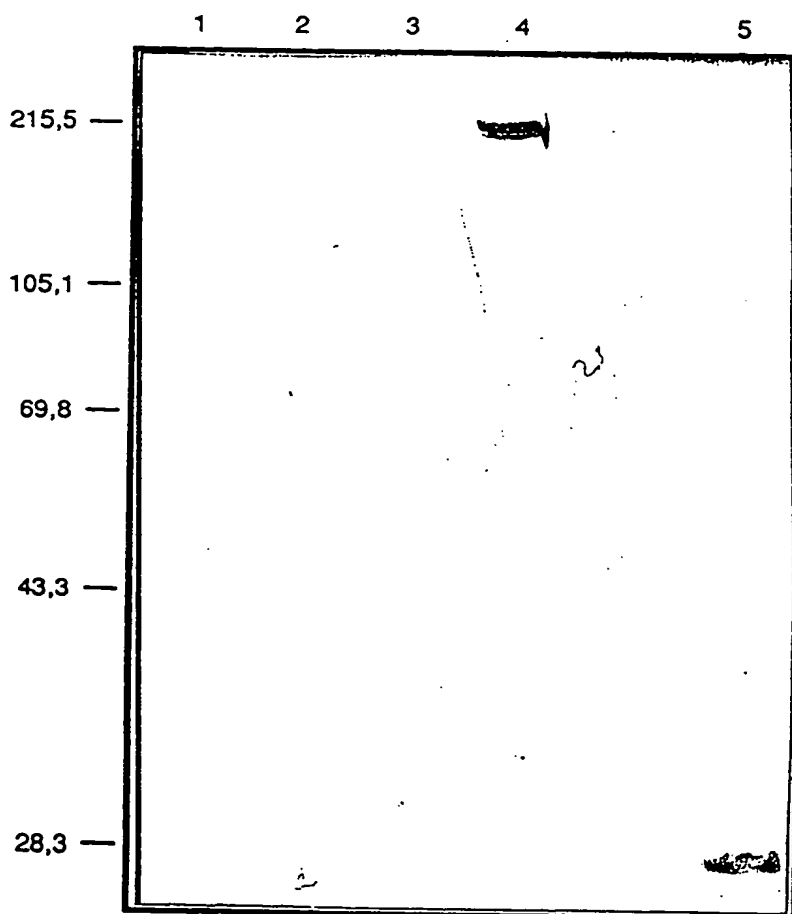


FIGURE 10

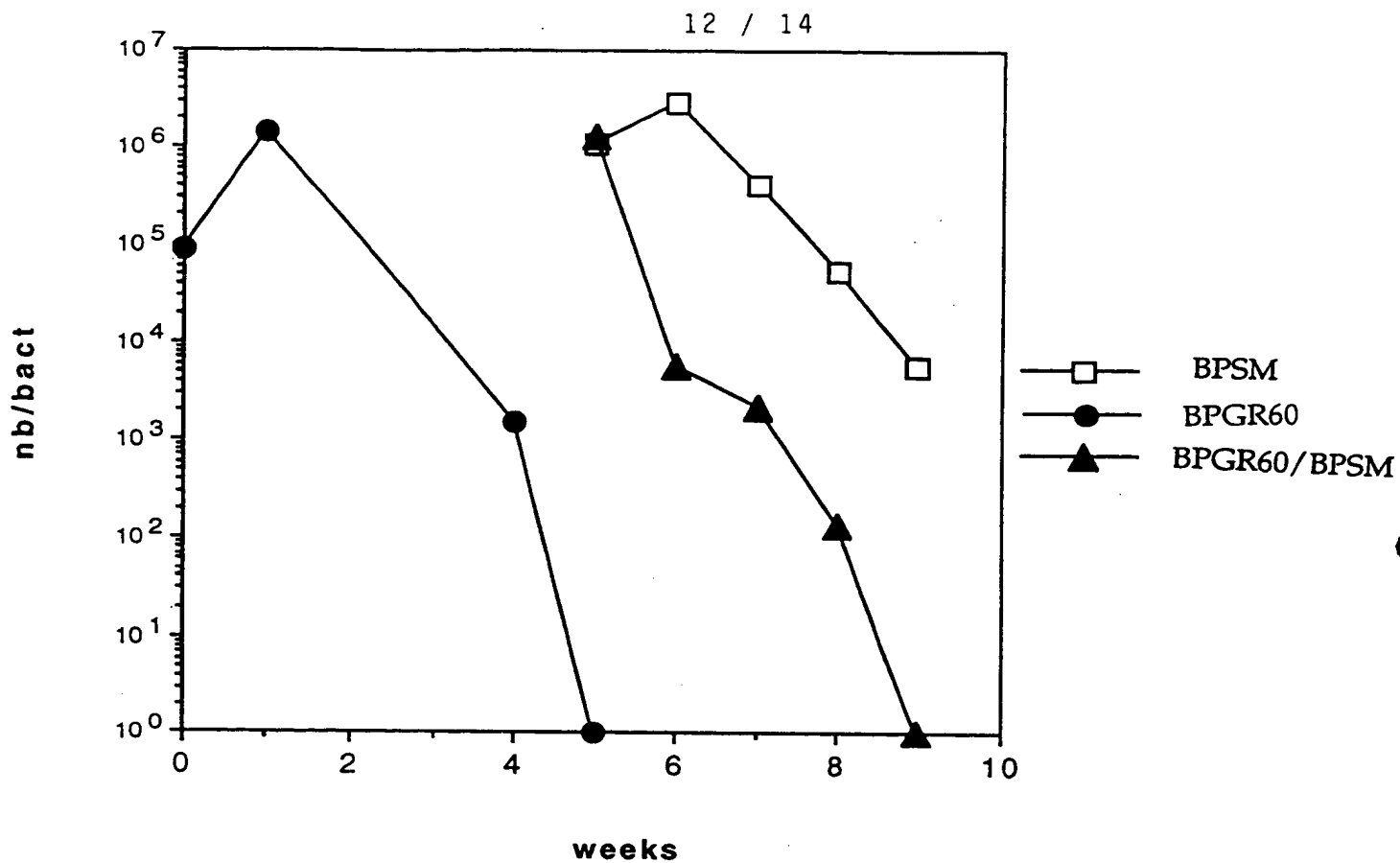


FIGURE 11A

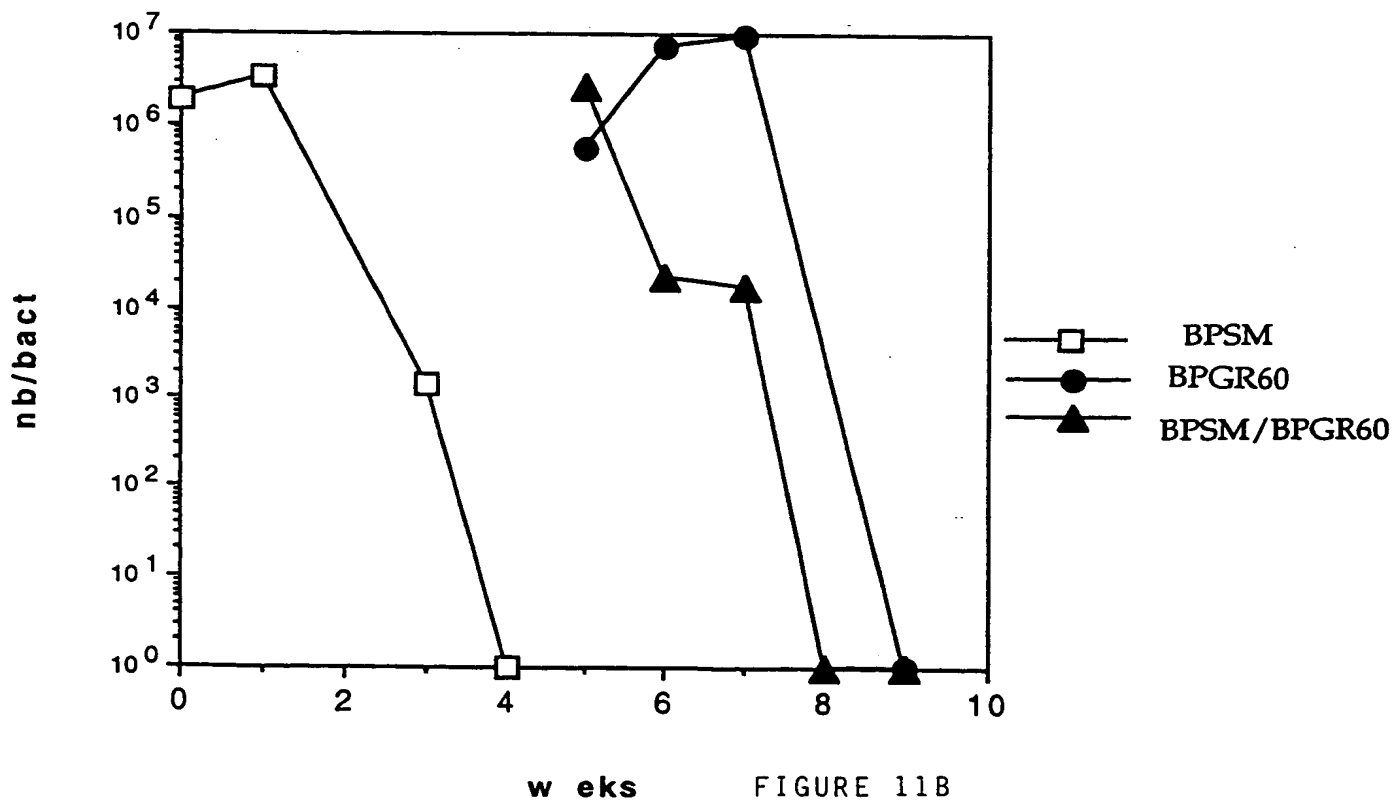


FIGURE 11B

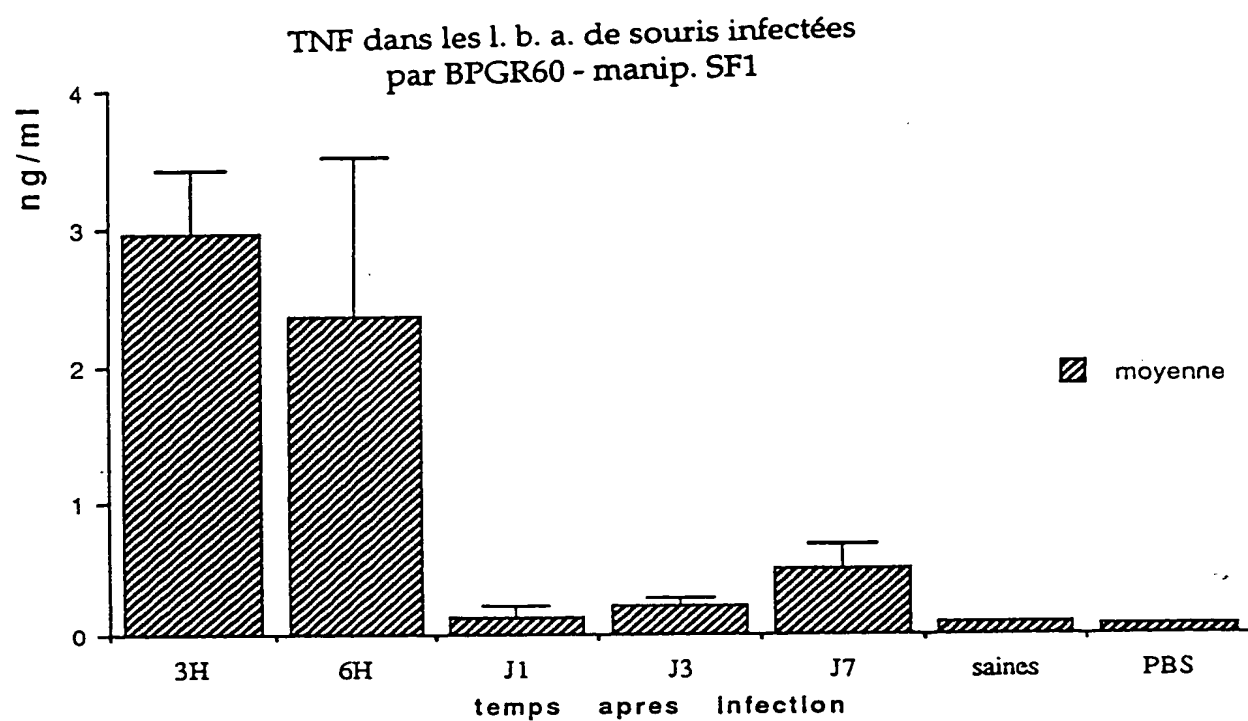


FIGURE 12A

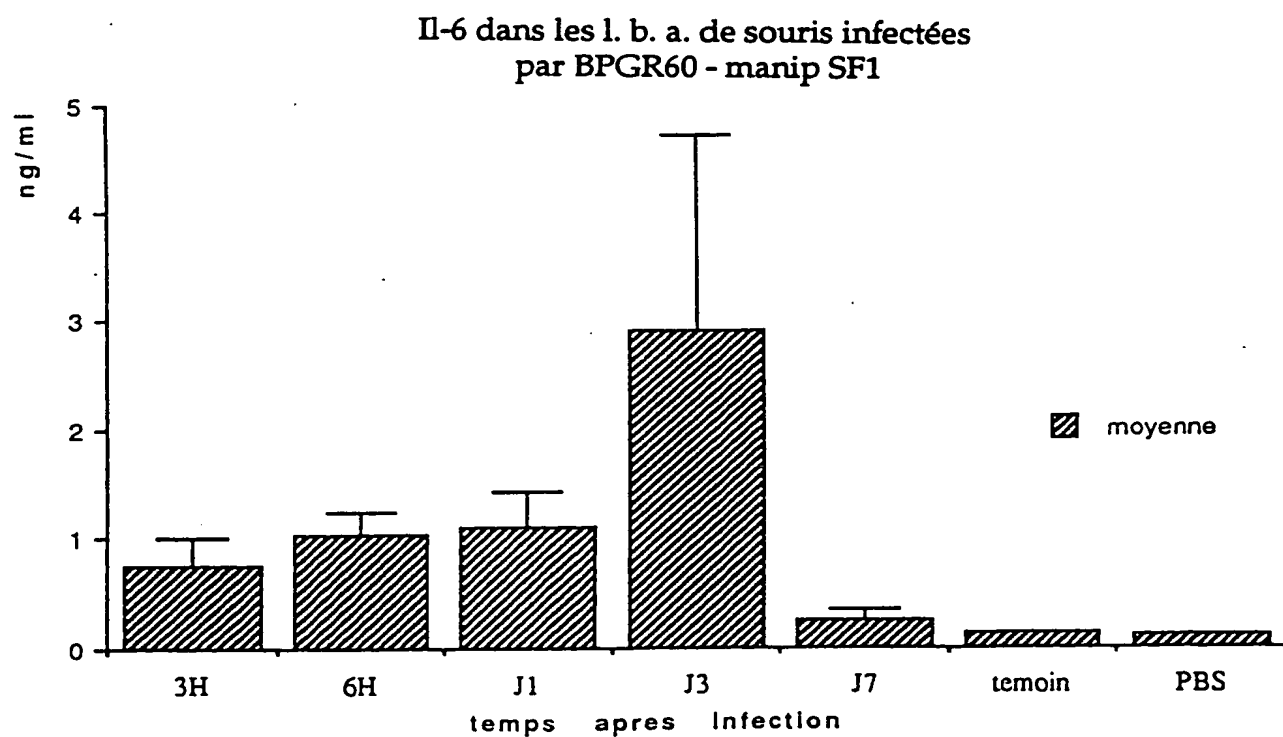


FIGURE 12B

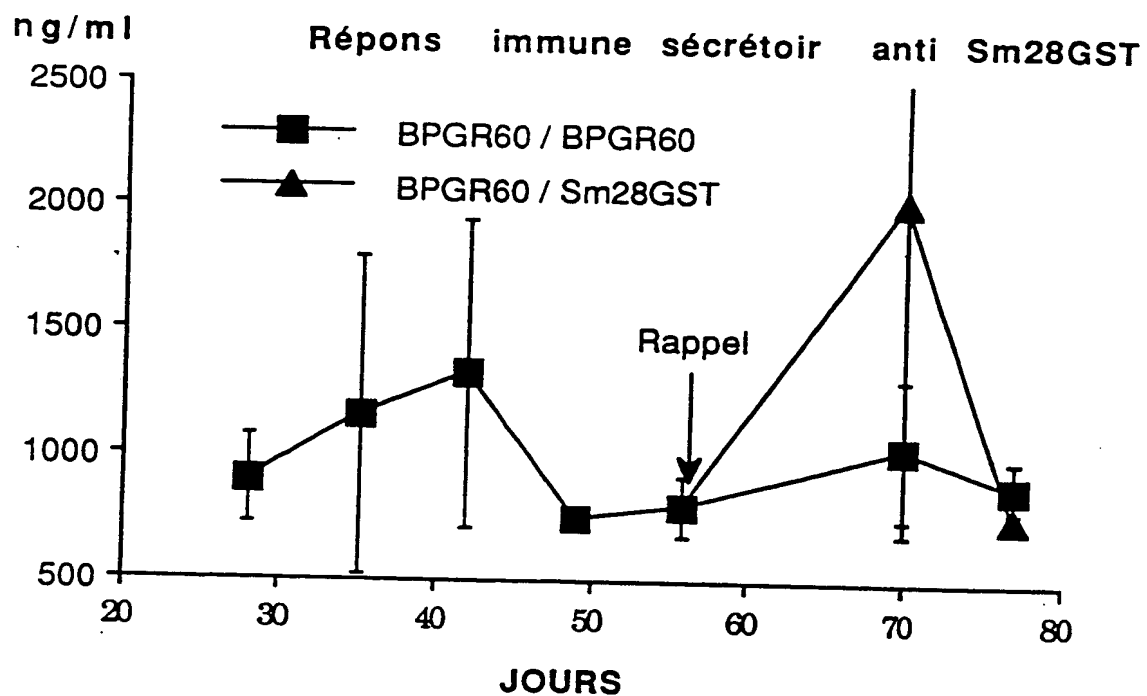


FIGURE 13A

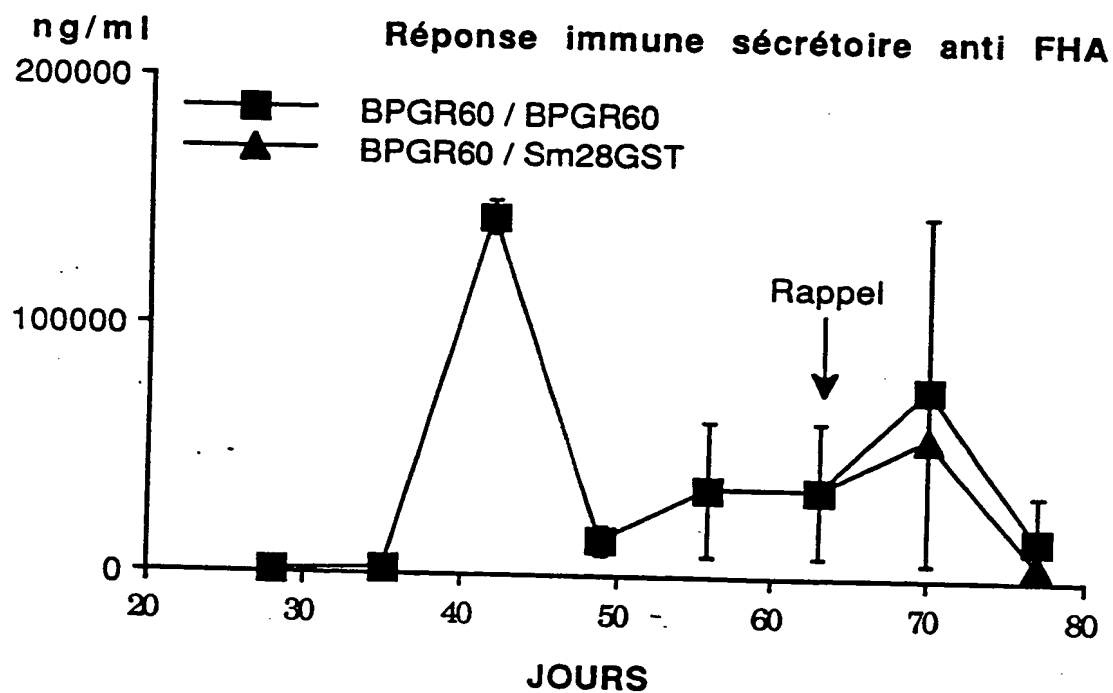


FIGURE 13B

2/14

FEUILLE 1 : 0.0.12E

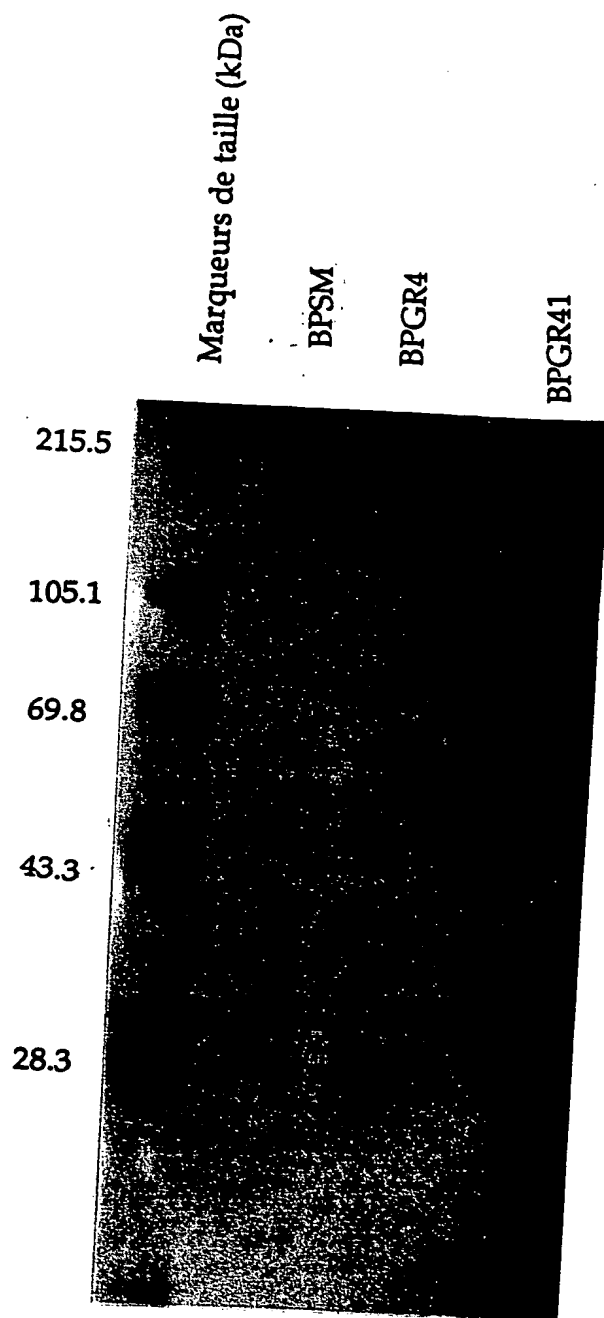


FIGURE 1

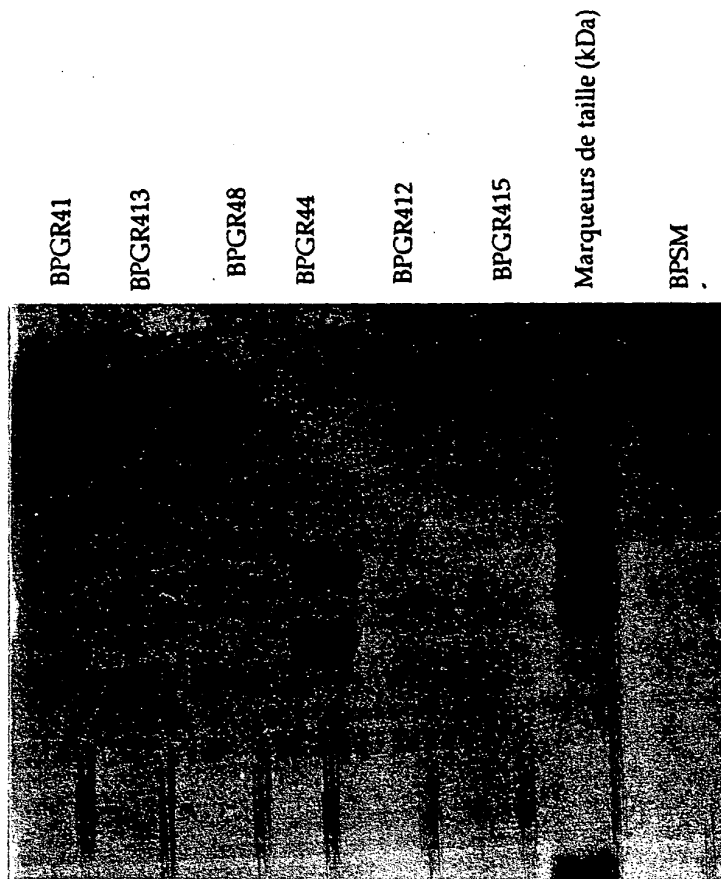
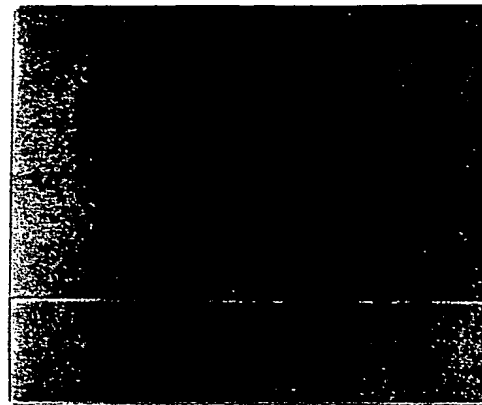


FIGURE 2A

6/24

FEUILLE RECTIFIÉE



BPSM

BPGR44

BPGR4

BPNJ1

FIGURE 5A

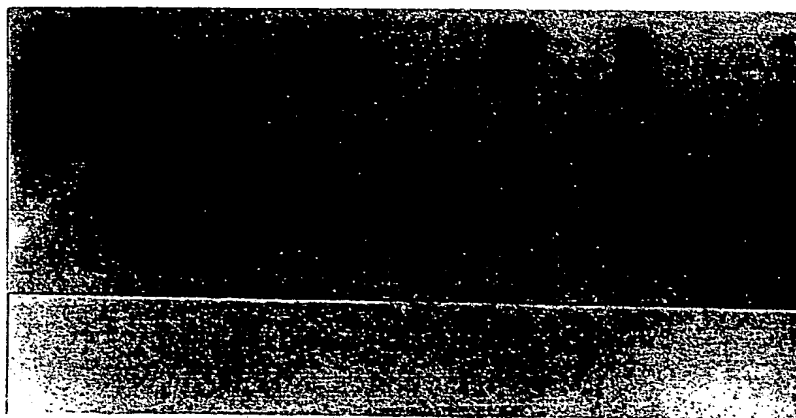
28.3

43.3

69.8

105.1

215.5



Sm28GST

BPGR44

BPNJ1

FIGURE 5B

7/14

FEUILLE RECTIFIÉE

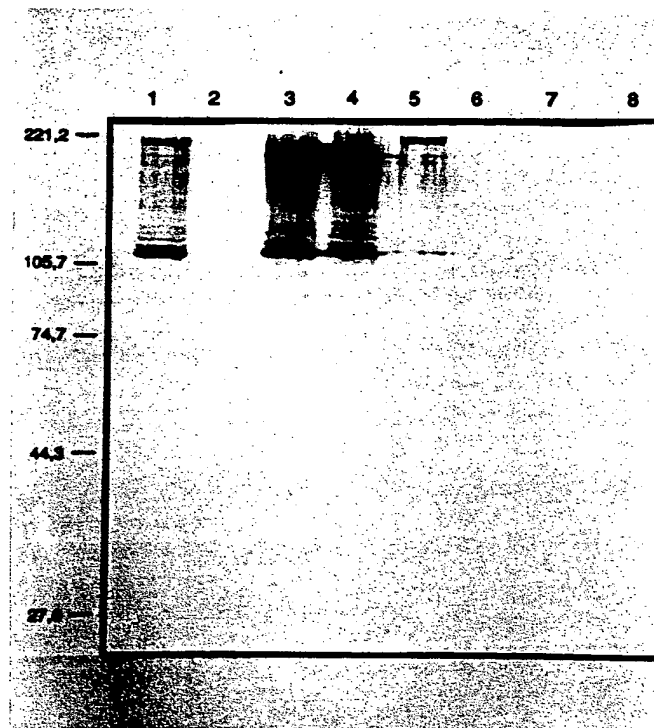


FIGURE 6

8/14

FEUILLE RELIÉE

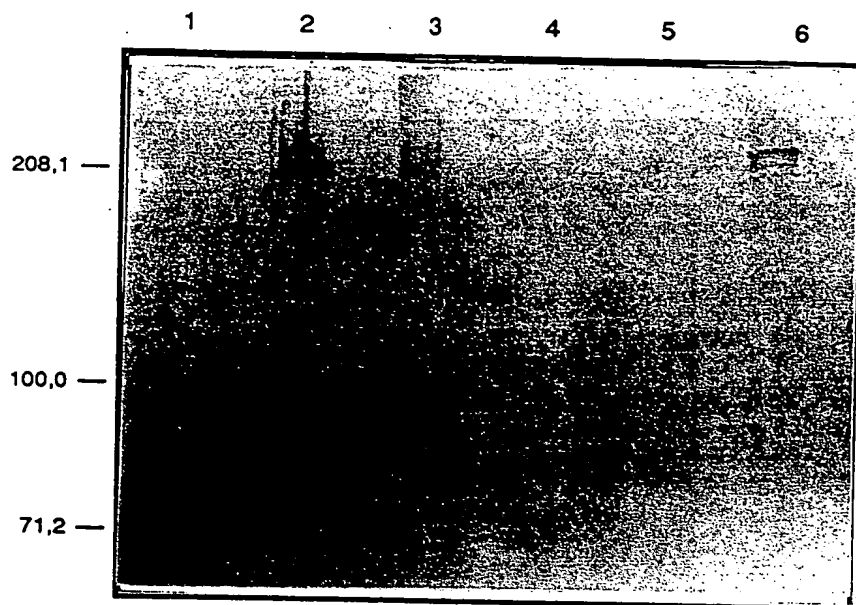


FIGURE 7

S/AL

FEUILLE RECTIFIÉE

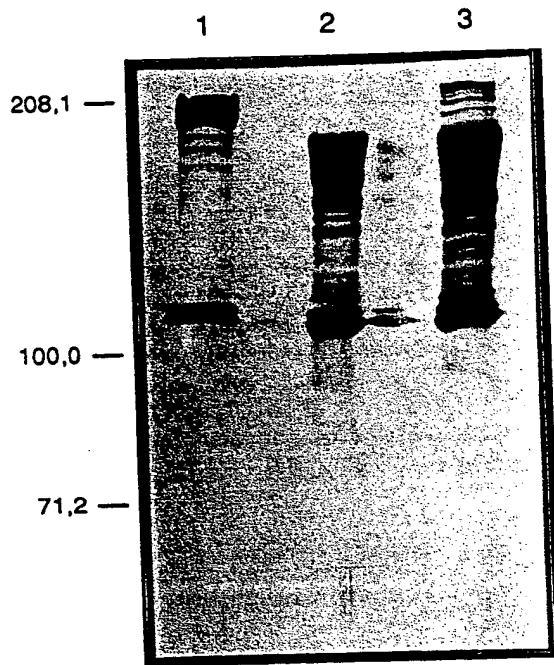


FIGURE 8

20/24

FEUILLE RECTIFIÉE

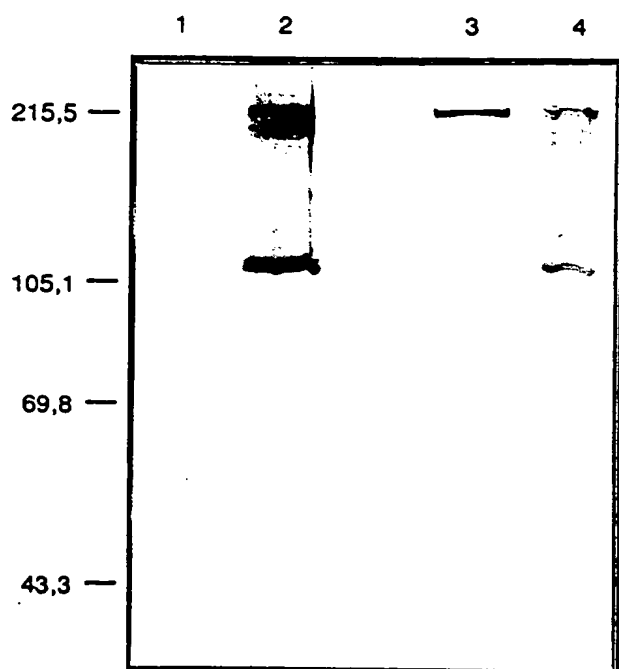


FIGURE 9

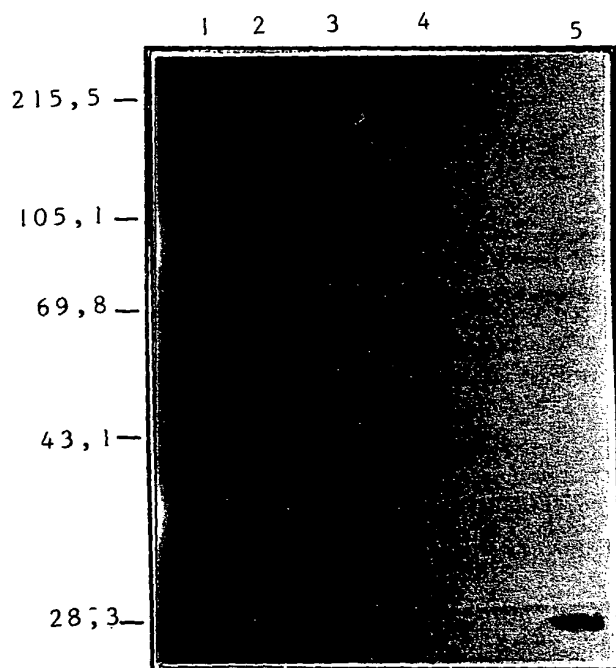


FIGURE 10